

**Die Metabolisierung und Ausscheidung
von D (-) - Milchsäure -
Versuche an Ratten mit spezifischen
biochemischen Methoden**

Angelika Fabritius

1974

Aus dem
Institut für Tierphysiologie der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c.mult. J. Brüggemann

Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D. Giesecke

Die Metabolisierung und Ausscheidung
von D(-)-Milchsäure -
Versuche an Ratten mit spezifischen
biochemischen Methoden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Angelika Fabritius
aus Gschwend

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme
Referent: Prof. Dr. D. Giesecke
Korreferent: Prof. Dr. G. Terplan

Tag der Promotion: 22. Februar 1974



Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. LITERATUR UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1 Zur Biochemie der Milchsäure	1
1.2 Umsetzung von D(-)-Milchsäure in tierischen Geweben	4
1.3 Problemstellung	11
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Versuchstiere, Haltung und Fütterung	13
2.2 Tierversuche	17
2.2.1 Versuche zur Messung von D(-)- und L(+)- Milchsäure im Blut nach Aufnahme von DL- Lactat in einer Testmahlzeit	17
2.2.2 Versuche zur Ausscheidung und Metaboli- sierung von D(-)-Milchsäure bei nutritiver Adaptation	18
2.2.3 Versuche zur Ausscheidung von D(-)- Milchsäure bei osmotischer Diurese	18
2.2.4 Versuche zur Metabolisierung und Aus- scheidung von ¹⁴ C-markiertem D(-)-Lactat	19
2.3 Biochemische Methoden	21
2.3.1 Messung der Utilisation von D(-)-Milch- säure in Gewebeschnitten von Leber und Zwerchfell	21

	Seite
2.3.2 Exhalationsradiometrische Messungen	23
2.3.3 Enzymatische Bestimmung von Milchsäure-Isomeren	23
2.3.4 Messung der ^{14}C -Aktivität in Harnproben	25
2.4 Statistische Methoden	26
3. ERGEBNISSE	27
3.1 Milchsäure-Isomere im Blut nach einer Testmahlzeit	27
3.2 Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn bei nutritiver Adaptation	34
3.3 Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn bei intraperitonealer Applikation und osmotischer Diurese	36
3.4 Metabolisierung von D(-)-Milchsäure in Gewebeschnitten in vitro	40
3.5 Metabolisierung und Ausscheidung von ^{14}C -D(-)-Milchsäure in vivo	42
4. DISKUSSION	54
4.1 Resorption und Ausscheidung	54
4.2 Metabolisierung und Retention	58
4.3 Adaptation	61
5. ZUSAMMENFASSUNG SUMMARY	63
6. LITERATURVERZEICHNIS	67

1. LITERATUR UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Zur Biochemie der Milchsäure

Schon vor rund 200 Jahren wurde festgestellt, daß Milchsäure als saurer Bestandteil in Lebensmitteln vorkommt. Da diese erstmals von SCHEELE (1780) in saurer Milch entdeckt wurde, erhielt sie die Bezeichnung Milchsäure. BERZELIUS (1807), LIEBIG (1847) und ENGELHARDT (1848) bewiesen die Identität der in saurer Milch und im Fleisch ("Paramilchsäure") gefundenen Säure. 1873 bestätigte WISLICENUS die Strukturgleichheit der "beiden" Säuren, fand aber eine unterschiedliche optische Aktivität und führte dieses Phänomen auf eine verschiedenartige räumliche Anordnung der Atome im Molekül zurück. Milchsäure entsteht durch Fermentation von Kohlenhydraten (FREMY, 1839; GAY-LUSSAC, 1839; BENSCH, 1847) und ist auf diese Weise seit 1881 industriell herstellbar. (Zitate nach HOLTEN, 1971)

Die Milchsäure, eine 2-Hydroxysäure: $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$, existiert in zwei stereoisomeren Formen, die als D- und L-Form bezeichnet werden. Da das C-2-Atom asymmetrisch ist, erfolgt eine Drehung des polarisierten Lichtes nach rechts (+) bzw. links (-); (BANCROFT u. DAVIS, 1931). Die optische Drehung der Milchsäure-Isomere ist gering, ebenso die ihrer Salze, die zu den freien Säuren einen entgegengesetzten Drehsinn aufweisen. D(-)-Milchsäure ist linksdrehend, ihr Na-Salz ist rechtsdrehend. Zur Vereinfachung spricht man vom D(-)-Milchsäure-Salz auch als D(-)-Lactat, wobei sich der Drehsinn auf die freie Säure bezieht. Über physikalische und chemische Eigenschaften geben LOOCKWOOD u. YORDER (1964/65), HOLTEN (1971) sowie viele andere Auskunft.

Milchsäure entsteht als Endprodukt der Kohlenhydrat-Fermentation durch anaerobe Mikroorganismen. Einige Bakterienarten sind befähigt reine Milchsäure-Isomere zu bilden: z.B. *Lactobacillus casei* bildet L(+)-Milchsäure, *Lactobacillus leichmannii* D(-)-Milchsäure; andere liefern ein optisch inaktives Racemat wie z.B. *Lactobacillus plantarum* (BERGEY, 1957). Dieses beruht auf der Reduktion von Pyruvat zu Lactat mittels der den Mikroorganismen eigenen stereospezifischen Lactat-Dehydrogenasen L(+)-LDH und D(-)-LDH oder einer LDH und einer Racemase, da bisher noch keine LDH gefunden wurde, die sowohl L(+)- als auch D(-)-Lactat bildet (LADD u. WALKER, 1959; TARMY u. KAPLAN, 1965; LEY u. SCHELL, 1962; DENNIS u. KAPLAN, 1963).

Der tierische Organismus hingegen setzt Glucose über die anaerobe Glycolyse (Embden-Meyerhof-Weg) nur zu L(+)-Lactat um; dieses zeigten z.B. schon 1913 LEVENE u. MEYER bei der Inkubation von zerkleinertem Kaninchennierengewebe mit D-Glucose, weiterhin BRIN (1964). Diese Reaktion dient der schnellen Energiegewinnung bei Sauerstoffmangel in Skelettmuskel- und Herzgewebe sowie der normalen Energiegewinnung der Erythrozyten, wobei pro Mol Glucose 2 Mol ATP gebildet werden. Retina-, Embryonal- und Tumorgewebe z.B. bilden Lactat unter aeroben Bedingungen = aerobe Glycolyse (BUDDECKE, 1971; HOLTEN, 1971).

Die meisten Gewebe, die Milchsäure bilden, sind auch in beschränktem Maße zu deren Oxydation befähigt (BRIN, 1964/65). Eine bekannte Ausnahme z.B. sind die Erythrozyten (RAPOPORT, 1968). Hauptsächlich jedoch wird die Milchsäure, die z.B. bei intensiver Muskelarbeit vermehrt gebildet wird, über das Blut zur Leber transportiert, wobei im Blut Lactatkonzentrationen bis 100 mg / 100 ml erreicht werden können (BUDDECKE, 1971). In der Leber wird Lactat über Pyruvat zu CO_2 und H_2O abgebaut oder über den Weg der Gluconeogenese zu Glucose resynthetisiert, die dann wieder als Energielieferant allen Geweben zur Verfügung steht - sog. Cori-

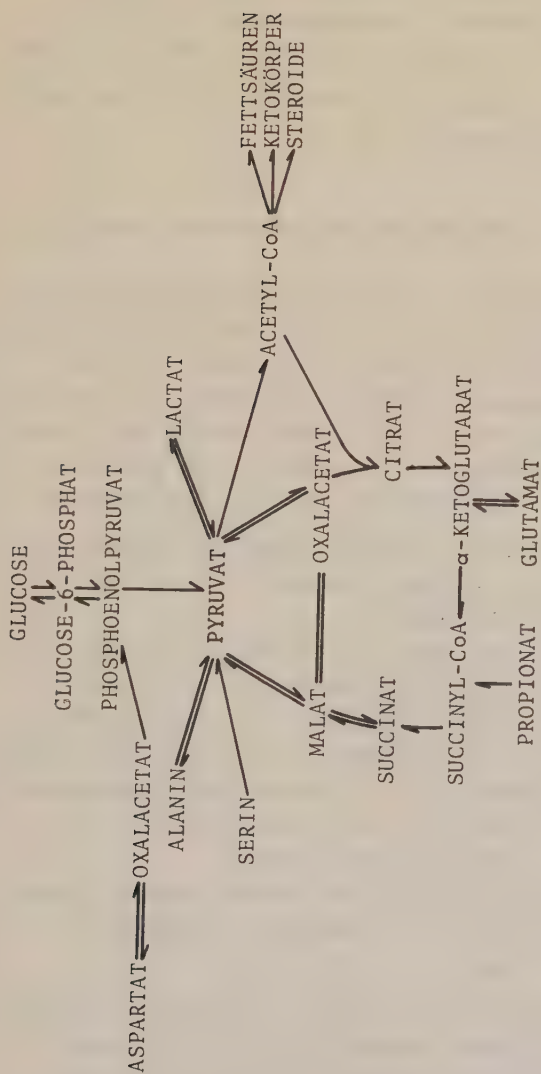


Abb. 1 Stellung von Lactat im intermediären Stoffwechsel (nach KARLSON, 1972)

Zyklus (CORI u. CORI, 1929). Der Lactatmetabolismus wird sowohl durch glycolytische Enzyme (bes. Phosphofructokinase) als auch durch Hormone (Adrenalin, Insulin, Glucagon, Corticosteroide) reguliert (SCRUTTON u. UTTERER, 1968). Über die Stellung von Lactat im intermediären Stoffwechsel gibt folgendes Schema Auskunft (Abb.1).

1.2 Umsetzung von D(-)-Milchsäure in tierischen Geweben

Die Untersuchungen über den Stoffwechsel von Milchsäure im Säugetierorganismus beziehen sich weitgehend auf das "physiologische" L(+)-Isomer, doch liegen auch über die Umsetzung des sogenannten "unnatürlichen" D(-)-Isomers Befunde vor. Die Tabellen 1, 2 und 3 fassen einige der bisherigen Untersuchungen über die Resorption, Ausscheidung im Harn und Metabolisierung von D(-)-Milchsäure zusammen.

Nach diesen Befunden wird D(-)-Milchsäure aus dem Magen-Darm-Kanal resorbiert, was eine Erhöhung des D(-)-Lactat-spiegels im Blut zur Folge hat.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß D(-)-Milchsäure in vivo in wechselndem Maße oxydiert werden kann. Auch in isolierten Organen oder Geweben erfolgt die Oxydation bzw. der Umsatz (Eliminierung) von D(-)-Milchsäure teils in gleichem Maße wie beim L(+)-Isomer, teils in wesentlich geringerem Umfang (Tab.2). Zur Bildung von Glucose wird D(-)-Milchsäure wenig oder garnicht verwendet (Tab.3).

Bei oraler Verabreichung von D(-)-Milchsäure werden schon nach 3 Stunden 23 - 29 % D(-)-Milchsäure unverändert im Harn ausgeschieden (Tab.3).

Da aufgrund des erhöhten O_2 -Verbrauches angenommen werden konnte, daß das D(-)-Isomer ebenso wie das L(+)-Isomer über Pyruvat der biologischen Oxydation zugeführt wird, müßte ein der L(+)-LDH entsprechendes Enzym im Tierkörper existieren, welches D(-)-Milchsäure zu Pyruvat oxydiert. TUBBS stellte 1964 aus acetongetrockneten Mitochondrien

Tabelle 1

Resorption und erhöhter D(-)-Lactatspiegel im Blut nach oraler Applikation

Species	Versuchsergebnis	Autor
Ratte	positiv	DAKIN (1908)
Ratte	positiv	CORI u. CORI (1929)
Ratte	positiv	MEDZIHRADSKY u. LAMPRECHT (1966)
Rind	positiv	DUNLOP u. HAMMOND (1965)
Schaf	positiv	WILLIAMS u. MACKENZIE (1967)

Tabelle 2

Oxydation und Utilisation von D(-)-Milchsäure im Vergleich zum L(+)-Isomer

Tierart u. Behandlung	Versuchsergebnisse	Autor
Ratte, in vivo	fast gleiche Oxydation mit zeitlichem Unterschied	(1964)
Kaninchen, in vivo (evisceriert)	geringere Oxydation	(1964)
Ratte, in vitro	geringerer O ₂ -Verbrauch (Leber, Niere) gehemmter O ₂ -Verbrauch (Gehirn)	MEYERHOF u. LOHMANN (1926)
Ratte, in vitro	fast gleiche Oxydation in durchströmter Leber	(1965)
Ratte, in vitro u. Ente, in vitro	geringere Substrateliminierung (Leber) gleiche Substrateliminierung (Herz) geringerer O ₂ -Verbrauch (Herz) geringere ¹⁴ CO ₂ -Produktion (Herz, Leber)	(1952)
Ratte, in vitro u. Schaf, in vitro	geringere Substrateliminierung; Ratte (Leber), Schaf (Leber) keine Substrateliminierung; Schaf (Pansen)	(1967)

Tabelle 3

Verwendung für die Gluconeogenese und Harnausscheidung von D(-)-Milchsäure bei Ratten

Organ u. Behandlung	Versuchsergebnis	Autor	
Leber, in vivo	kein Einbau in Glucose	CORI u. CORI	(1929)
Leber, in vivo	geringer Einbau in Glucose	HOBERMAN u. D'ADAMO	(1960)
Skelettmuskel, in vivo	geringer Einbau in Glucose	WARNOCK et al.	(1964)
Intaktes Tier 3 Stunden nach Gabe von 170 mg D(-)-MS pro 100 g Körpergewicht per Schlundsonde	Harnausscheidung 29 % der verabreichten Menge D(-)-MS	CORI u. CORI	(1929)
Intaktes Tier 3 Stunden nach Gabe von 125 mg D(-)-MS pro Tier per Schlundsonde	Harnausscheidung 23 % der verabreichten Menge D(-)-MS	MEDZIHRADESKY u. LAMPRECHT	(1966)

Tabelle 4

Aktivität von gereinigter D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase⁺
aus Organen verschiedener Tiere (nach CAMMACK, 1969)

Species	Niere	Leber	Herz	Gehirn	Skelettmuskel	Milz
Ratte	106	155	55	29		11
Meerschweinchen	46	86	64			
Taube	107	55	32	15	25	
Frettchen	136	89	51	27	9	
Kaninchen	264	24	22	9		
Lamm	51	41	11			
Schwein	63	37				
Ochse	40	47				

⁺) Einheiten / kg Frischgewicht; 1 Einheit = Oxydation von 1 μ M D(-)-Lactat / min

aus Leber und Niere von Kaninchen eine reine Lösung von D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase her, welche - nur in vitro nachweislich - D(-)-Milchsäure zu Pyruvat oxydierte.

CAMMACK (1969) charakterisierte dieses Enzym als Zn- und FAD-haltiges Flavoprotein und wies sein Vorkommen in Organen verschiedener Tierarten nach (Tab.4).

Das Vorhandensein eines Enzyms, das in der Lage ist, die Oxydation von D(-)-Lactat in vivo zu katalysieren, könnte die Ursache der in vivo beobachteten Umsetzung von D(-)-Milchsäure sein. In diesem Sinne weist CAMMACK (1969) in einer Arbeit darauf hin, daß möglicherweise die D(-)-Milchsäure-Acidose der Wiederkäuer, "ein dramatisches Beispiel" für die starke D(-)-Lactatproduktion der Vormagenbakterien (DUNLOP u. HAMMOND, 1965), im Zusammenhang steht mit der von ihm beobachteten geringen Aktivität der D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase in Geweben von Wiederkäuern.

Bis heute ist es noch nicht gelungen, die physiologische Funktion dieser D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase zu klären. ELLIOTT zeigte 1959, daß D(-)-Lactat eine Zwischenverbindung im "Aminoaceton-Zyklus" ist, worauf schon frühere Arbeiten von DAKIN u. DUDLEY (1913) und NEUBERG (1913) über die Umwandlung von Methylglyoxal in D(-)-Lactat hinwiesen (Abb.2).

Dieser Zyklus läuft weitverbreitet in tierischen Geweben ab und spielt eine Rolle bei der Metabolisierung von Threonin über Aminoaceton und Methylglyoxal zu D(-)-Lactat (DAGLEY u. NICHOLSON, 1970) und mit Hilfe einer Dehydrogenase zu Pyruvat (ELLIOTT, 1959). Jedoch könnte Methylglyoxal auch unter Umgehung von D(-)-Lactat mittels einer 2-Ketoaldehyd-Dehydrogenase direkt zu Pyruvat umgewandelt werden (MONDER, 1967).

Darüberhinaus haben HUENNEKENS, MAHLER u. NORDMANN (1951) auf die Existenz einer 2-Hydroxysäuren-Racemase in Leber- und Nierengewebe von Kaninchen hingewiesen, ein interessanter Befund, der noch einer Bestätigung bedarf.

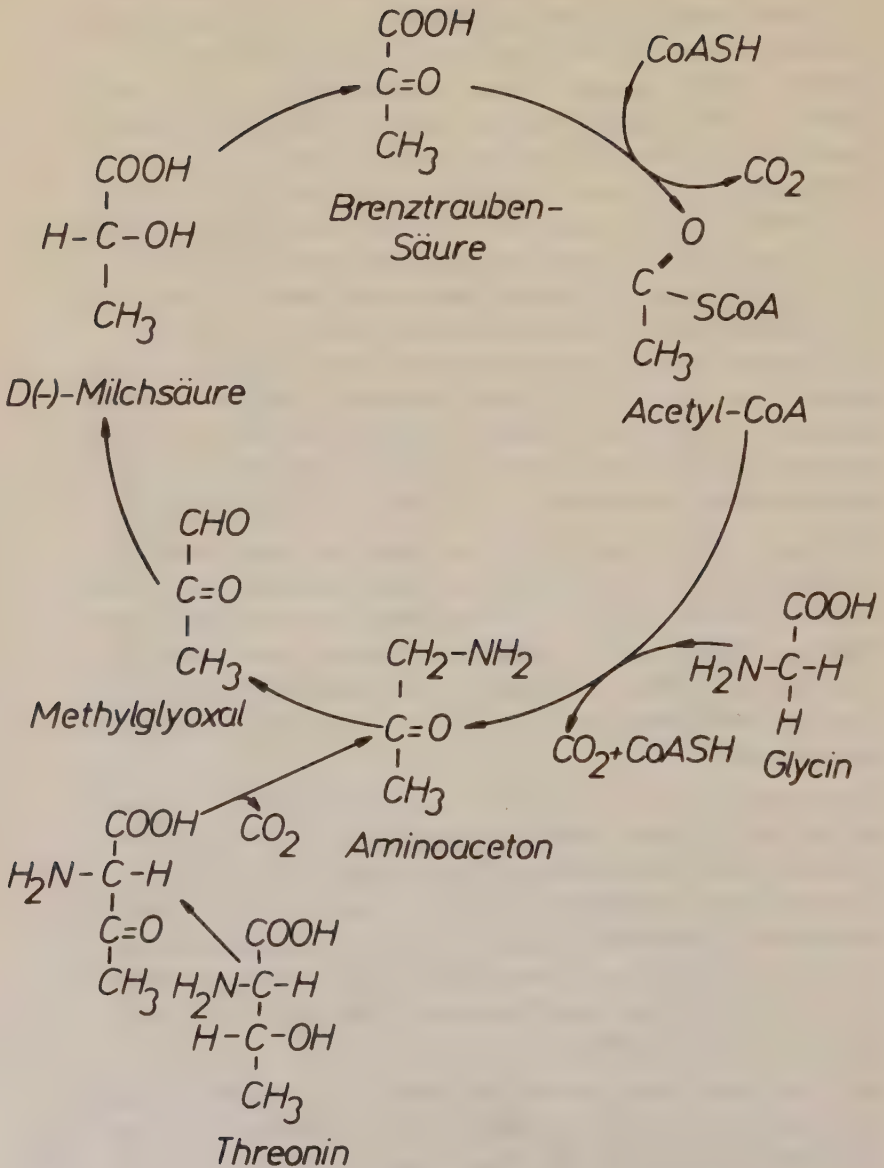


Abb. 2 Aminoaceton-Zyklus (nach ELLIOTT, 1959)

1.3 Problemstellung

Die aufgezeigten Überlegungen zum Stoffwechsel von D(-)-Milchsäure sind nicht allein von theoretischem Interesse. Denn D(-)-Milchsäure kann dem Menschen über verschiedene Nahrungsmittel wie Sauermilchprodukte, Sauerkraut, Früchte, dem Tier über das Futter (Silage, Sauermolkenprodukte, industrielle Fermentationsrückstände) - meist als Bestandteil der racemischen Milchsäure - in teils erheblichem Maße zugeführt werden. Bei Mensch und Tier kann als Produkt der mikrobiellen Flora des Magen-Darm-Kanals neben L(+)-Milchsäure auch das D(-)-Isomer gebildet werden. So weist z.B. der Magen von Schwein, Pferd und Kaninchen sowie der Kropf des Huhnes typische Milchsäuregärungen auf.

Die bisher bekannten Messungen zum Stoffwechsel von D(-)-Milchsäure erfolgten vorwiegend nur relativ zum Umsatz von L(+)-Milchsäure. Soweit quantitative Untersuchungen durchgeführt wurden (Tab.3), blieb eine nutritive Adaptation, d.h. die Anpassung an die Umsetzung von D(-)-Milchsäure bei Verabreichung mit der Nahrung unberücksichtigt. Die bislang angewandten Methoden zur Untersuchung des Stoffwechsels von D(-)-Milchsäure waren einerseits zwar spezifisch, aber unempfindlich (polarimetrische Bestimmung von D(-)-Milchsäure), andererseits zwar empfindlich, aber unspezifisch, wie die Ermittlung von D(-)-Milchsäure als Differenz von kolorimetrisch bestimmtem DL-Lactat (BARKER u. SUMMERSON, 1941) und enzymatisch bestimmtem L(+)-Lactat. Erst seit wenigen Jahren steht eine enzymatische Methode zur Verfügung, die eine standardisierbare, empfindliche und spezifische Bestimmung erlaubt (GAWEHN u. BERGMAYER, 1971).

Mangels spezifischer und empfindlicher Methoden konnte bisher auch die Isomerenreinheit der verwendeten D(-)-Milchsäure nicht mit der wünschenswerten Genauigkeit überprüft werden. Bekannt ist z.B. in diesem Sinne die Poly-

merisierung und intramolekulare Isomerisierung von Milchsäure in konzentrierten Lösungen (LOOCKWOOD u. YORDER, 1964/65).

Eine Bearbeitung der Utilisation von D(-)-Lactat unter Berücksichtigung der nutritiven Adaptation erschien daher mit neuen methodischen Voraussetzungen unerlässlich. Die nachfolgenden Untersuchungen zur Resorption, Metabolisierung und Harnausscheidung von D(-)-Milchsäure wurden an Ratten durchgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

Für die Durchführung dieser Arbeit standen isomerenreine D(-)-Milchsäure und eine spezifische und empfindliche enzymatische Bestimmungsmethode für D(-)-Milchsäure sowie ^{14}C -(U)-D(-)-Milchsäure und eine Anlage zur Messung der ^{14}C - und CO_2 -Ausscheidung zur Verfügung.

Im folgenden wurde zunächst an nicht adaptierten Ratten die Anflutung von D(-)-Milchsäure im Blut nach einer lactathaltigen Testmahlzeit (2.2.1) gemessen. An mit dem Futter an D(-)-Lactat adaptierten und nicht adaptierten Ratten erfolgten Untersuchungen über die Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn (2.2.2, 2.2.3) und über die Umsetzung von D(-)-Milchsäure in Geweben bei Inkubation mit D(-)-Milchsäure in vitro (2.2.2). Ebenfalls an nutritiv adaptierten und nicht adaptierten Ratten wurde die Ausscheidung von $^{14}\text{CO}_2$ in der Expirationsluft sowie von ^{14}C -D(-)-Milchsäure im Harn nach der Verabreichung von ^{14}C -(U)-D(-)-Milchsäure (2.2.4) untersucht.

2.1 Versuchstiere, Haltung und Fütterung

Als Versuchstiere dienten 200 - 300 g schwere, männliche und weibliche Albinoratten (Sprague-Dawley), die ausgewogen nach Geschlecht und Gewicht in Versuchsgruppen geteilt wurden. In Versuchen mit Testmahlzeiten und in Versuchen zur nutritiven Adaptation erhielten die Tiere eine gereinigte Diät in Pulverform. Zur Gewöhnung an die Aufnahme von pulverförmiger Nahrung wurden die Tiere einzeln oder zu dritt in normalen Käfigen mit einhängbarem Futternapf, der gegen die Verstreuung von Futter mit einem Drahtgeflecht abgedeckt war, gehalten. Zur Gewinnung von Harnproben dienten Bilanzkäfige aus Plexiglas mit Kot-Harn-Separator, wie sie von SCHILLER (1960) beschrieben wurden (vgl. Abb. 3).

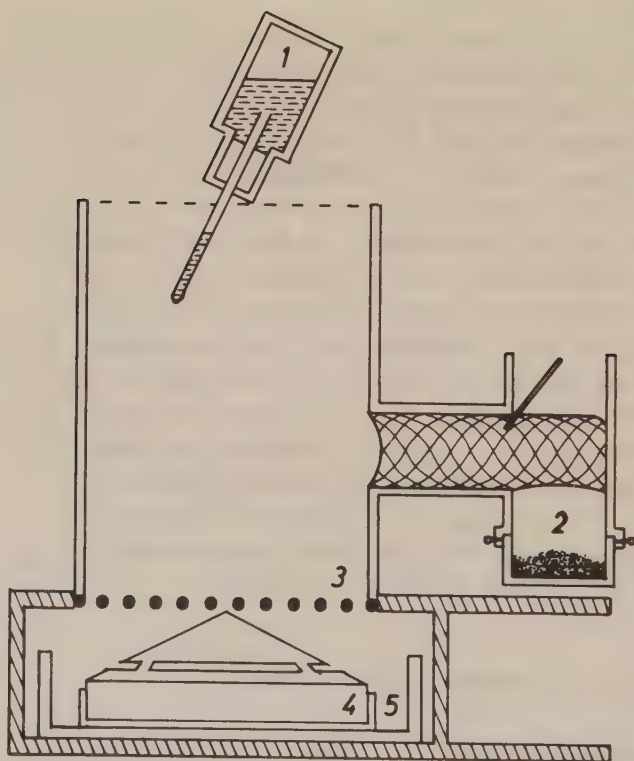


Abb. 3 Stoffwechselkäfig nach SCHILLER

1. Wasser

2. Futter

3. Bodenrost

4. Harn

5. Kot

Tabelle 5

Zusammensetzung der Diät -0- in % der Endmischung

isoliertes Sojaprotein	14,85
Methionin	0,15
Rohrzucker	20,00
Sojaöl	5,00
Zellulose	3,00
Mineralstoffmischung ⁺	5,00
Vitaminvormischung ⁺⁺	1,00
Maisstärke	ad 100,00

⁺) Mineralstoffmischung; entsprechend einem Zusatz pro kg Futter von: 15,0 g CaCO_3 , 14,0 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 10,0 g K_2PO_4 (sicc.), 8,0 g NaCl , 7,0 g Na_2HPO_4 (sicc.), 5,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,48 g Fe-Citrat, 0,45 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,04 g ZnCO_3 , 0,0195 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0005 g KJ, 0,01 g NaF

⁺⁺) Vitaminvormischung; entsprechend einem Zusatz pro kg Futter von: 10 000 I.E. Vit. A, 1 000 I.E. Vit. D₃, 25 mg Vit. E, 2 mg Vit. K₃, 25 mg Thiamin, 15 mg Riboflavin, 8 mg Pyridoxin, 100 mg Nikotinsäure, 20 mg Ca-Pantothenat, 0,03 mg Vit. B₁₂, 4 mg Folsäure, 0,3 mg Biotin, 2 000 mg Cholinchlorid, 25 mg Ascorbinsäure

Tabelle 6

Zusammensetzung der Lactatdiäten (in %)

Substanz	Diät-10-	Diät-5-
DL-Ca-Na-Lactat	10,00	5,00
Saccharin	0,15	0,15
Sojaöl	0,50	0,25
Standard-Pulverdiät	89,35	94,60
Gehalt an D(-)-Milchsäure (g/kg)	31,00	15,50
Gehalt an L(+)-Milchsäure (g/kg)	55,00	27,50

Tabelle 7

Durchschnittlicher Futterverzehr bei Vorlage von
Testmahlzeiten (3 g) mit verschiedenem Lactatgehalt

Lactatgehalt (%)	Ø verzehrte Futtermenge (g)
50	1,26
30	1,86
20	2,61
10	2,95

Da ein Lactat enthaltendes Futter aufgrund der erforderlichen Nährstoffzusammensetzung nur schwer pelletiert werden kann, erhielten die Tiere zur Gewöhnung an pulverförmige Nahrung wenigstens 7 Tage lang ein einer Standarddiät für Ratten entsprechendes Pulverfutter = Diät -0- (Zusammensetzung Tab. 5). Vor Beginn der nutritiven Adaptation wurde die Diät -0- unbegrenzt vorgelegt; zur Gewöhnung an die schnelle Aufnahme einer Testmahlzeit erhielten die Tiere morgens und nachmittags 10 g der Diät -0-. Das Lactatfutter wurde aus der Standard-Pulverdiät hergestellt, wobei ein DL-Ca-Na-Lactat (Roth, Karlsruhe) mit einem Gehalt von 31 % D(-)-Milchsäure und 55 % L(+)-Milchsäure isocalorisch gegen Maisstärke ausgetauscht und zur Geschmacksverbesserung Saccharin und Sojaöl beigemischt wurden.

Als Testmahlzeit diente eine Diät mit 10 % Lactat (Diät -10-), zur nutritiven Adaptation an D(-)-Lactat eine Diät mit 5 % Lactat (Diät -5-). Die Zusammensetzung ist in Tab. 6 aufgezeigt.

In Vorversuchen mit Testmahlzeiten nahmen die Tiere höherprozentiges Lactatfutter in nicht zufriedenstellender Menge auf (s.Tab.7).

Die Diät -10- wurde den Tieren 15 Minuten vorgelegt; zur Adaptation erhielten die Tiere über 7 bzw. 15 Tage die Diät -5- ad libitum. Wasser stand unbegrenzt zur Verfügung.

2.2 Tierversuche

2.2.1 Versuche zur Messung von D(-)- und L(+)-Milchsäure im Blut nach Aufnahme von DL-Lactat in einer Testmahlzeit

In der Vorversuchsperiode wurden 30 Albinoratten 14 Tage in Einzelkäfigen an die Diät -0- gewöhnt. Eine Versuchsgruppe bildeten jeweils 6 Tiere, die nach einem Nahrungsentzug von 24 Stunden 3 g der Testmahlzeit Diät -10- über 15 Minuten zur Aufnahme erhielten. Die Tiere jeweils einer Versuchsgruppe wurden 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten nach der

Futtermittelgabe mit Äther narkotisiert und Blutproben aus der Pfortader und der Aorta entnommen. Nach Durchtrennung der Aorta trat der Tod durch Entblutung ein.

In der gleichen Weise wurden Blutproben von mit Diät -O- gefütterten Ratten (Kontrollgruppe) erhalten.

Die Fixierung und Aufbereitung der Blutproben ist unter 2.3.3 beschrieben.

2.2.2 Versuche zur Ausscheidung und Metabolisierung von D(-)-Milchsäure bei nutritiver Adaptation

Zwei Versuchsgruppen von je 6 männlichen Ratten wurden an die Haltung in Stoffwechselkäfigen und an die Diät -O- gewöhnt. Dann erhielt die Kontrollgruppe die Diät -O-, die Versuchsgruppe die Diät -5- über 14 Tage. Täglich wurde aus der Versuchsgruppe stichprobenweise der 24-Stunden-Harn quantitativ gewonnen.

Am 16. Versuchstag wurden Versuchs- und Kontrolltiere nach einer Hungerperiode von 24 Stunden durch Genickschlag unblutig getötet, sofort eröffnet und die Organe Leber und Zwerchfell für die Messung der Utilisation von D(-)-Milchsäure im WARBURG'schen Respirations-Apparat entnommen (s.2.3.1).

2.2.3 Versuche zur Ausscheidung von D(-)-Milchsäure bei osmotischer Diurese

Zur zeitlich genaueren Untersuchung der Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn dienten 10 männliche Albinoratten. In diesem Periodenversuch wurden die Tiere zunächst an die Diät -O- und Stoffwechselkäfige gewöhnt. Am 1. Versuchstag erhielten die Tiere je eine Injektion von 1 ml steriler, mit NaOH neutralisierter D(-)-Milchsäure-Lösung (Serva, Heidelberg) in einer Konzentration von 26,4 mg D(-)-Milchsäure/ 1 ml Injektionslösung intraperitoneal und zur Aus-

lösung der osmotischen Diurese⁺ 8 ml einer 5 %igen Glucose-lösung verteilt subcutan. Der Harn wurde 3, 9 und 24 Stunden post injectionem aus der Auffangschale quantitativ gewonnen.

Die vorherige Auslegung der Harnauffangschalen mit flüssigkeitsabstoßender Folie (Parafilm) erleichterte das Sammeln der Harnproben wesentlich.

Die Tiere erhielten sodann über 6 Tage die Diät -5- zur freien Aufnahme. Die verzehrten Futtermengen wurden täglich ermittelt.

Am 8. Versuchstag wurde den Tieren erneut D(-)-Milchsäure- und Glucoselösung injiziert, und 3, 9 und 24 Stunden p. i. der Harn wie oben gewonnen.

Die Fixierung und Aufbereitung der Harnproben ist unter 2.3.3 beschrieben.

2.2.4 Versuche zur Metabolisierung und Ausscheidung von ^{14}C -markiertem D(-)-Lactat

Nutritiv an D(-)-Lactat adaptierten und nicht adaptierten Ratten wurde ^{14}C -(U)-D(-)-Milchsäure i.p. appliziert und der Gehalt an $^{14}\text{CO}_2$ in der Atemluft sowie die Radioaktivität und der Gehalt an unmarkierter D(-)-Milchsäure im Harn gemessen.

Um in einen günstigen Meßbereich von ^{14}C und CO_2 zu kommen, wurden in diesen Versuchen Gruppen von jeweils 3 Tieren verwendet. Die Tiere erhielten nach einer Hungerperiode von 24 Stunden innerhalb 2 Minuten eine i.p. Dosis von insgesamt ca. $5 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -D(-)-Milchsäure (Amersham-Buchler, Braunschweig). Die spezifische Aktivität (SA) wurde in den verschiedenen Versuchen durch Zusätze von inaktiver mit NaOH neutralisierter D(-)-Milchsäure (Serva, Heidelberg)

⁺) Für wertvolle Ratschläge sei Herrn Professor Dr.A. Schmid, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, bestens gedankt.

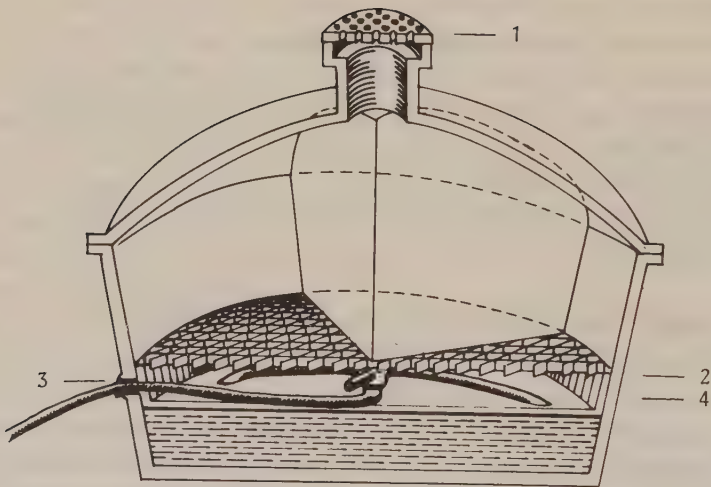


Abb. 4 Atemglocke für Ratten

- 1. Luftfilter
- 2. Bodengitter
- 3. Gasabsaugvorrichtung
- 4. Harnauffangschale

variiert. Die einzelnen Dosierungen und Aktivitäten werden zusammen mit den Ergebnissen wiedergegeben.

Zum Vergleich wurden außerdem Versuche mit entsprechenden Dosierungen von ^{14}C -(U)-L(+)-Milchsäure durchgeführt. Die hierbei verwendeten Tiere erhielten Diät -O-.

Die 3 Tiere wurden gemeinsam in eine Atemglocke gesetzt (s. Abb. 4). Die Atemglocke, ein gut schließender Exsiccator, war mit Zinkblech in 4 enge Käfige unterteilt, der Boden bis 3 cm unter dem Käfigrost luftdicht mit Kunstharz ausgegossen (Totraum ca. 5 l) und mit einer eingepaßten Harnauffangschale versehen. Über ein Filter wurde Frischluft zugeführt; der Luftdurchsatz betrug $0,2 \text{ m}^3/\text{h}$. Die CO_2 - und ^{14}C -Konzentration in der unter dem Sitzrost abgesaugten Expirationsluft wurde mittels eines Exhalationsmeßgerätes (Berthold-Friesecke, Karlsruhe) über 6 Stunden laufend gemessen und registriert.

Zur Bestimmung der Radioaktivität und des D(-)-Milchsäuregehaltes im Harn wurde die von den 3 Tieren in der Versuchszeit von 6 Stunden abgesetzte Gesamtmenge aus der Auffangschale quantitativ gewonnen.

2.3.1 Messung der Utilisation von D(-)-Milchsäure in Gewebeschnitten von Leber und Zwerchfell

Leber und Zwerchfell der frisch getöteten Tiere wurden sofort in gekühlten, mit 95 % O_2 / 5 % CO_2 (Carbogen) begasten Puffer (Atmungslösung nach KREBS; COLOWICK u. KAPLAN, 1955) verbracht. Von der Leber wurden mittels einer Schneidevorrichtung (in eine Halterung gespannte Rasierklinge) Schnitte von geringer Dicke hergestellt, die, ebenso wie das Zwerchfell in gekühlter Pufferlösung schwimmend, in ca. 1 cm^2 große, glattrandige, möglichst nur aus organspezifischem Gewebe bestehende Stücke zugeschnitten wurden. Die Zeitdauer zur Herstellung der Schnitte betrug durchschnittlich 9 Minuten. Tabelle 8 gibt die an Übungsschnitten ermittelten Schnittdicken wieder.

Tabelle 8

Berechnete Dicke von Gewebeschnitten aus Rattenleber

	Gewicht (mg)				Fläche (mm ²)		Schnitt-	
	trocken		frisch				dicke (mm)	
n	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$
9	8,42	2,42	28,87	9,56	79,33	22,05	0,38	0,11

Zur Inkubation der Gewebe mit DL-Lactat dienten WARBURG-Gefäße mit Zentralgefäß und einer Anhangsbirne, das Gesamtvolumen betrug ca. 15 ml.

Es wurden pro Tier von jedem Gewebe 4 Inkubationsansätze (Parallelansätze) hergestellt. Ein Inkubationsansatz bestand aus 2 ml in den Hauptraum pipettierter Pufferlösung (Atmungslösung nach KREBS), dem darin schwimmenden Gewebeschnitt und 0,4 ml Na-DL-Lactatlösung (Roth, Karlsruhe) mit 20 μ M Milchsäure in der Anhangsbirne.

Zur Messung des Gasaustausches wurden die beschickten WARBURG-Gefäße an offene Doppelkapillarmanometer angeschlossen und in einen Schüttelthermostaten (Braun, Messungen) verbracht.

Temperatur 37° C

Schwingungen 86/min

Amplitude 3 cm

Begasungsphase mit 95% O₂/ 5% CO₂ - 15 min

Druck- und Temperatenausgleichsphase - 10 min

Inkubationszeit 120 min

Es wurde eine CO₂-haltige Gasphase gewählt, da sich in Vorversuchen zur Überprüfung, inwieweit die CO₂-Konzentration in der Gasphase die Veratmung von D(-)-Lactat in Geweben von Leber und Zwerchfell der Ratte in vitro beeinflußt, keine signifikanten Unterschiede ergaben.

Der Gehalt der Ansatzlösung an D(-)-Milchsäure nach 2 Stunden Inkubation wurde enzymatisch bestimmt (s.2.3.3).

Zur Bestimmung der Anfangskonzentration (O-Ansatz) wurde pro Tier je ein Leber- sowie Zwerchfellschnitt in 2 ml Pufferlösung und 0,4 ml DL-Lactatlösung mit 0,6 N HClO_4 im Verhältnis 1:1 fixiert.

2.3.2 Exhalationsradiometrische Messungen

In dem Exhalationsmeßgerät erfolgte die Messung des CO_2 -Gehaltes mit einem Infrarot-Absorptionsgerät, die Messung der ^{14}C -Aktivität mit einem Methandurchfluß-Zähler mit einem Nutzeffekt von 13,5%. Ein Mehrkurven-Punktplotter zeichnete folgende Meßdaten auf: Impulsrate und prozentualen CO_2 -Gehalt, außerdem das Integral der Meßwerte über die Meßzeit sowie den Quotienten Impulsrate / CO_2 -Gehalt.

In den Ergebnissen ist der zeitliche Verlauf der ^{14}C -Ausscheidung in der Expirationsluft als Impulsrate / % CO_2 in Kurven wiedergegeben.

Für den genauen Vergleich der Ausscheidung bei Ratten mit und ohne Adaptation an D(-)-Milchsäure wurde in einigen Versuchen außerdem die standardisierte spezifische Aktivität der ^{14}C -Expiration berechnet als $\mu\text{Ci } ^{14}\text{C} / \text{M C pro } \mu\text{Ci } ^{14}\text{C injiziert} / \text{kg Körpergewicht}$.

Die Berechnung der oxydierten D(-)-Milchsäure erfolgte unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der verabreichten D(-)-Milchsäure und des Körpergewichts der Tiere.

2.3.3 Enzymatische Bestimmung von Milchsäure-Isomeren

Sofort nach der Gewinnung wurden je 1 ml der Blutproben (2.2.1), der auf 50 ml angefüllten und 1:20 (bzw. 1:10) verdünnten Tagesharnproben (2.2.2) und des Inkubationsansatzes (2.3.1) im Verhältnis 1:1 mit 0,6 N HClO_4 fixiert und enteiweißt. Im Tierversuch 2.2.3 wurden die Harnproben mit HClO_4 so fixiert, daß eine 0,3 N saure Lösung von möglichst geringem Volumen entstand. Von den zur Messung der Radioakti-

vität mit Thymol fixierten 6-Stunden-Harnproben (s.2.3.4) wurde von jeder Probe 1 ml 1:1 mit 0,6 N HClO_4 enteiweißt. Nach dem Zentrifugieren der Lösungen über 10 Minuten bei $7.100 \cdot g$ ließ sich der klare Überstand zur enzymatischen Bestimmung verwenden.

Die Bestimmung beruhte auf folgendem Prinzip:

Lactat + NAD + Hydrazin $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Pyruvat-Hydrazon + NADH + H^+
Lactat wurde quantitativ umgesetzt, da Pyruvat als Hydrazon abgefangen wurde. Die NADH_2 -Bildung, gemessen an der Extinktionszunahme im Photometer EPPENDORF bei 340 (334, 366) nm, war Meßgröße. Dieses Prinzip galt sowohl für L(+)- als auch für D(-)-Lactat jeweils mit den stereospezifischen Enzymen (HOHORST, GAWEHN u. BERGMAYER, 1970).

Die Bestimmung von L(+)- und D(-)-Milchsäure erfolgte in Anlehnung an obengenannte Autoren nach dem von BOEHRINGER für die Bestimmung von L(+)-Milchsäure angegebenen Bestimmungsansatz.

Bestimmungsansatz:

	Probe bzw. Standard	Leerwert
Puffer	2,0 ml	2,0 ml
Überstand nach Enteiweißung		
bzw. Standard	0,1 ml	-
Perchlorsäure 0,6 N	-	0,1 ml
LDH, L(+) bzw. D(-)	0,03 ml	0,03 ml
NAD	0,2 ml	0,2 ml

Meßbedingungen:

Wellenlänge - 366 nm

Glas-Küvette - 1 cm Schichtdicke

Temperatur - 25°C

Messung gegen Luft

Die Reagenzien wurden gemischt und nach dem Starten der Reaktion durch Zugabe von NAD genau 1 Stunde bei 25°C im

Wasserbad inkubiert. Im Photometer EPPENDORF wurden die Extinktionen der Proben (E_P), der Standards (E_S) und der Leerwerte (E_L) gegen Luft gemessen.

Verwendete Reagenzien:

- a) Puffer = Glycin - Hydrazin - Puffer, pH 9,0
(0,5 M Glycin, 0,4 M Hydrazinsulfat, 0,4 mM Titriplex III)
- b) LDH (Boehringer), L(+)-LDH aus Schweinemuskeln,
D(-)-LDH aus *Lactobacillus leichmannii*
- c) NAD (Boehringer) 0,027 M
- d) Standard: Li-D(-)-Lactat 9 μg / 0,1 ml
Na-L(+)-Lactat 9 μg / 0,1 ml

Berechnung: $E_P - E_L = \Delta E_P$; $E_S - E_L = \Delta E_S$

Aus ΔE_S und der Standardkonzentration wurde der Faktor

$$F = \frac{9}{\Delta E_S} \text{ gebildet.}$$

$$\Delta E_P \cdot F \cdot 1\,000 = \text{mg Lactat} / 100 \text{ ml}$$

Bei der Metabolisierung von D(-)-Lactat im WARBURG-Inkubationsansatz (2.3.1) bildete die Differenz aus mg D(-)-Lactat im O-Ansatz und mg D(-)-Lactat im Bestimmungsansatz die Menge des eliminierten D(-)-Lactats.

2.3.4 Messung der ^{14}C -Aktivität in Harnproben

Die gewonnenen Harnproben (2.2.4) wurden mit einigen Thymolkristallen fixiert und mit A. tridest. auf 25 ml aufgefüllt. Je 1 ml wurde mit 20 ml BRAY-Scintillator-Flüssigkeit versetzt und die Aktivität (Imp/ml) im Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer (Tri Carb, Modell 3357; Packard Instrument Company, Inc., La Grange, Illinois, USA) gemessen.

Zusammensetzung der BRAY-Scintillator-Flüssigkeit:

Methanol	100 ml
Äthylenglycol	20 ml
Naphtalin	60 g
PPO	4 g
POPOP	0,1 g
Dioxan	ad 1 000 ml

Die Zähl-Ausbeutebestimmung erfolgte mit einem Toluol-Standard (interne Standardisierung).

Unter Berücksichtigung der verabreichten Aktivität der ^{14}C -(U)-D(-)-Milchsäure wurde die prozentuale Ausscheidung von D(-)-Milchsäure bzw. von C-haltigen Stoffwechselprodukten der D(-)-Milchsäure im Harn berechnet.

2.4 Statistische Methoden

Aus den parallelen Einzelergebnissen wurde der Mittelwert ($\bar{x}$) errechnet und - mit wenigen Ausnahmen - die Streuung (s^2) nach SACHS (1972) angegeben. Zur Prüfung der Nullhypothese ($\bar{x}_1 = \bar{x}_2$) unabhängiger Stichproben diente der t-Test. Mit den nach SACHS (1972) berechneten t-Werten wurde für die zugehörigen Freiheitsgrade in der p-Wert-Tabelle von OTTO (1958) die Signifikanz ($p < \dots$) ermittelt.

Beim Vergleich abhängiger Stichproben (Periodenversuch 3.3) berechnete sich die Signifikanz nach dem WILCOXON-Test für Paardifferenzen (nach SACHS, 1972).

Für die genannten Berechnungen diente der Tischrechner Olivetti programma 101.

3. ERGEBNISSE

3.1 Milchsäure-Isomere im Blut nach einer Testmahlzeit

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Resorption von Milchsäure-Isomeren aus dem Verdauungstrakt wurden Blutproben aus der Vena portae und der Aorta von Ratten nach einer lactathaltigen Testmahlzeit (Diät -10-) auf den Gehalt an L(+)- und D(-)-Milchsäure überprüft.

Die mit der Testmahlzeit aufgenommene Menge an D(-)- und L(+)-Milchsäure sowie das Totgewicht der Tiere sind in Tabelle 9 als Gruppenmittelwerte aufgeführt.

Der Versuch sollte zeigen, ob die beiden Milchsäure-Isomere gleich schnell resorbiert werden und ob nach der Verteilung über den Blutkreislauf, und damit über alle Organe, die Konzentration der Isomere in der Aorta im Vergleich zur Pfortader einen Hinweis für die Metabolisierung liefert. Die Ergebnisse des Versuches sind in den Tabellen 10 und 11 und in den Abbildungen 5 und 6 wiedergegeben.

Die in den Tabellen 10 und 11 angegebenen Mittelwerte der Isomerkonzentrationen in der Pfortader und in der Aorta zeigen eine nicht unerhebliche Streuung, was auf Unterschiede in der Magenentleerung und auf geringe Versuchstierzahl zurückgeführt werden kann. Jedoch waren die Unterschiede zwischen den Isomerkonzentrationen der zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben so beträchtlich, daß sich deutlich ein zeitabhängiger Konzentrationsverlauf erkennen ließ (s. Abb. 5). Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, daß die Resorption beider Isomere spontan nach der Futteraufnahme einsetzte.

In der Pfortader, die unter den gewählten Versuchsbedingungen schon eine Normalkonzentration von 2,8 mg D(-)-Milchsäure / 100 ml Blut aufwies, erreichte die Anflutung von D(-)-Milchsäure 30 Minuten nach Beginn der Futteraufnahme

Tabelle 9

Durchschnittlich aufgenommene Mengen der Testmahlzeit (Diät -10-) und von D(-)- und L(+)-Milchsäure im Anflutungsversuch

Versuchs- gruppe (je 6 Ratten)	Zeit der Proben- entnahme nach der Fütterung	aufgenommene Testfutter- menge (g)		aufgenommene D(-)-Milch- säure (mg)		Mengen von L(+)-Milch- säure (mg)		Totgewicht der Tiere (g)
		$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$	
	min							
1 ⁺	30	2,84	0,23	8,78	0,72	15,58	1,29	247,4 48,9
2 ⁺	60	2,97	0,03	8,20	0,09	16,33	0,16	249,5 55,5
3 ⁺	90	2,93	0,07	9,10	0,21	16,10	0,36	247,6 43,4
4	120	2,97	0,06	9,18	0,24	16,33	0,32	249,5 42,1
5	180	2,97	0,03	9,22	0,10	16,35	0,14	244,1 60,9

Mittelwert der Gruppen		2,94	0,06	9,10	0,18	16,14	0,33	247,6 2,2

⁺) Von je einem Tier konnte keine hinreichende Probenmenge gewonnen werden, da durch Schock bei der Tötung das Blut in die Organe des Splanchnicusgebietes abgeflossen war.

Tabelle 10

Konzentration von D(-)-Milchsäure im Blut nach einer Testmahlzeit

Zeit nach der Fütterung	Anzahl der Proben	Konzentration in der Pfortader (mg/100ml)	Anzahl der Proben	Konzentration in der Aorta (mg/100ml)	Differenz
min	n	$\bar{x}_1$	n	$\bar{x}_2$	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$
0	10	2,8	7	2,4	0,4
30	5	16,7	5	5,8	10,9
60	5	14,1	5	4,8	9,3
90	5	26,5	5	10,7	15,8
120	6	12,6	6	6,8	5,8
180	6	6,9	6	6,4	0,5

Tabelle 11

Konzentration von L(+)-Milchsäure im Blut nach einer Testmahlzeit

Zeit nach der Fütterung	Anzahl der Proben	Konzentration in der Pfortader (mg/100ml)	Anzahl der Proben	Konzentration in der Aorta (mg/100ml)	Differenz
min	n	$\bar{x}_1$	n	$\bar{x}_2$	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$
0	10	37,8	9	46,9	- 9,1
30	5	106,7	5	86,8	19,9
60	5	114,3	5	83,8	30,5
90	5	114,3	5	63,7	50,6
120	6	110,8	6	78,0	32,8
180	6	64,0	6	59,7	4,3

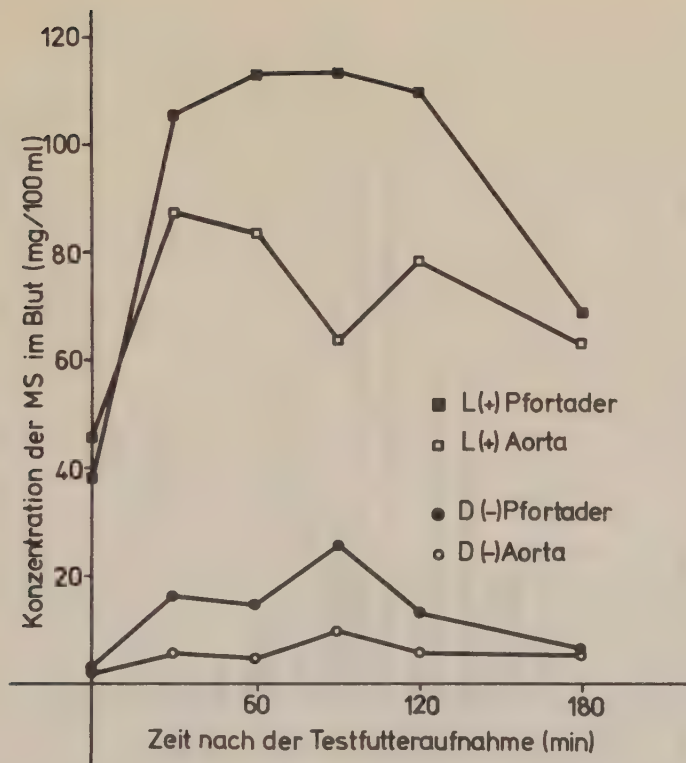


Abb. 5 Anflutung von D(-)- und L(+)-Milchsäure im Blut der Pfortader und Aorta von Ratten nach Aufnahme einer lactathaltigen Testmahlzeit

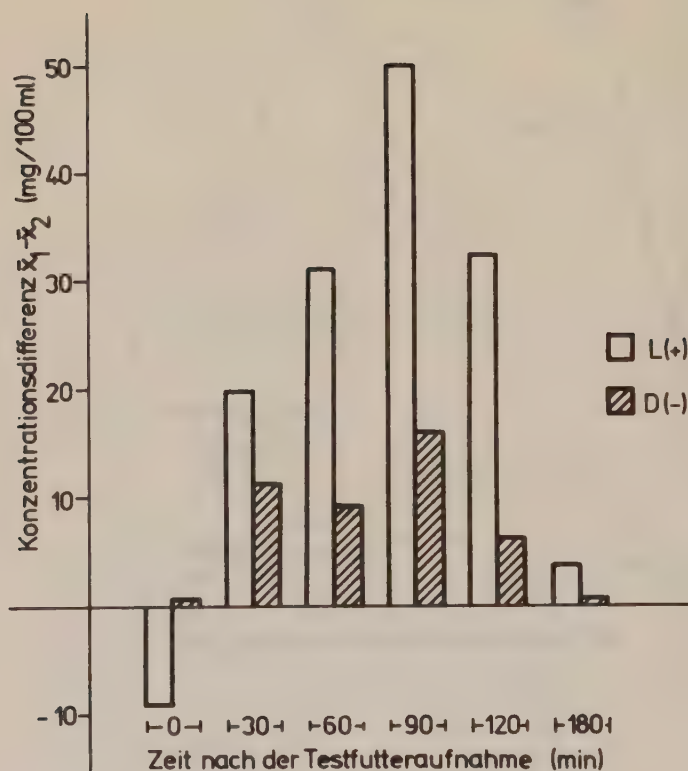


Abb. 6 Konzentrationsdifferenz von
Milchsäure-Isomeren in
Pfortader und Aorta

bereits einen ersten Höhepunkt (1. Peak). Nach einem leichten Abfall (60 Minuten nach Futteraufnahme) stieg die Konzentration nach 90 Minuten erneut an, und zwar fast auf das 10-fache der Normalkonzentration (2. Peak), um zunächst schnell, dann langsamer abzusinken. In der Aorta verlief die Änderung der D(-)-Milchsäurekonzentration analog zur Pfortader, blieb jedoch wesentlich geringer.

Aufgrund der beträchtlich höheren Normalkonzentration und dem ca. 2-fachen Gehalt von L(+)-Milchsäure in der Testmahlzeit (s.Tab.9) wurden bei der Anflutung von L(+)-Milchsäure im Vergleich zu D(-)-Milchsäure in der Pfortader größere Konzentrationen erzielt; die Anflutungskurve verlief steil, bildete ein Plateau (30 - 120 Minuten) und fiel steil wieder ab. Die zeitabhängige Konzentrationsänderung von L(+)-Milchsäure verlief in der Aorta nicht analog zur Pfortader.

In den Tabellen 10 und 11 sind neben den Isomerkonzentrationen die Differenzen Isomerkonzentration in der Pfortader - Isomerkonzentration in der Aorta aufgezeigt und in Abbildung 6 als Blockdiagramm dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß die Konzentrationsdifferenzen von L(+)-Milchsäure 2- bis 3-fach höher lagen als von D(-)-Milchsäure und daß die zeitabhängige Änderung der Konzentrationsdifferenz von L(+)-Milchsäure stetiger bis zu der für beide Isomere bei 90 Minuten liegenden höchsten Konzentrationsdifferenz anstieg und abfiel. Nach 180 Minuten waren für beide Isomere keine nennenswerten Konzentrationsdifferenzen feststellbar.

Die bei beiden Isomeren zwischen Pfortader und Aorta auftretenden Konzentrationsdifferenzen lassen darauf schließen, daß schon nach 30 bis 120 Minuten ein großer Teil Milchsäure entweder ausgeschieden oder metabolisiert worden ist.

Die im Vergleich zu D(-)-Milchsäure für L(+)-Milchsäure beobachteten höheren Konzentrationsdifferenzen können darin begründet sein, durch verstärkte Ausscheidung und/oder Metabolisierung eine unphysiologisch hohe Milchsäurekonzentration zu entstehen.

tration im Blut zu vermeiden (Plateau in der Anflutungskurve für L(+)-Milchsäure in der Pfortader). Dafür spricht, daß zur Zeit der stärksten Isomeranflutung (90 Minuten nach der Futteraufnahme) auch für D(-)-Milchsäure die größten Konzentrationsdifferenzen Pfortader/Aorta angetroffen wurden.

3.2 Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn bei nutritiver Adaptation

Der Versuch sollte zeigen, wie hoch die Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn bei Verabreichung einer lactathaltigen Diät liegt und ob Unterschiede in der Ausscheidung während des Versuchsverlaufes eine nutritive Adaptation erkennen lassen. Zu diesem Zweck wurden während einer Fütterungsperiode von 14 Tagen, in der die Versuchsgruppe (6 Ratten) die Diät -5- erhielt, in 17 Tagesharn-Stichproben der Gehalt an D(-)-Milchsäure bestimmt.

Die D(-)-Lactatbestimmung zeigte, daß die Proben in der gewählten Verdünnung, die bei einer Ausscheidung von 10 - 100 % der aufgenommenen Menge D(-)-Milchsäure eine genaue Messung zugelassen hätte, unterhalb des Meßbereiches lagen; d.h. von der aufgenommenen Menge D(-)-Milchsäure ($\bar{0}$ 145,8 mg pro Tier und Tag) wurden weniger als 10 % im Harn ausgeschieden.

Aufgrund der Annahme, daß zu Beginn der nutritiven Adaptation die Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn am höchsten ist, wurden die nach 1 und 2 Tagen Lactatfütterung gesammelten - und bereits verdünnten - Harnproben eingengt und erneut einer D(-)-Lactatbestimmung zugeführt.

Tabelle 12 gibt die Ergebnisse wieder.

Die Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn von 1 und 2 Tage nutritiv adaptierten Ratten lag unter 2 % der aufgenommenen Menge D(-)-Milchsäure. Geht man von einer vollständigen Resorption aus, so wurde die mit dem Futter verabreichte Menge D(-)-Milchsäure demnach zu 98 % retiniert und/oder umgesetzt. Aus diesem Grunde konnte von einer Prüfung der D(-)-Milchsäure im Harn nach 3 bis 14 Tagen Fütterung mit Lactatdiät abgesehen werden.

Nach 2-tägiger Fütterung mit einer Lactatdiät ließ sich anhand der Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn keine Adaptation erkennen.

Tabelle 12

Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im 24-Stunden-Harn von Ratten nach 1- und 2-tägiger Fütterung mit einer Lactatdiät (Diät -5-)

Messungen		Zeit der Lactatfütterung (d)	
		1	2
Anzahl der Tiere (n)		5	5
Ø Körpergewicht (g)		260	260
aufgenommene D(-)-MS (mg)	$\bar{x}$	127,5	164,2
	$\pm_s$	35,2	37,2
ausgeschiedene D(-)-MS (mg)	$\bar{x}$	1,92	1,85
	$\pm_s$	0,51	0,11
Ausscheidung in % der Aufnahme	$\bar{x}$	1,50	1,13
	$\pm_s$	0,46	0,38

3.3 Ausscheidung von D(-)-Milchsäure bei intraperitonealer Applikation und osmotischer Diurese

Aufgrund der Ergebnisse des Ausscheidungsversuches bei nutritiver Adaptation sollte der zeitliche Verlauf und die Höhe der Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn am 1. und 7. Tag der Adaptation geprüft und verglichen werden. Um allen Tieren am Versuchstag 1 und 7 die gleiche Menge D(-)-Milchsäure zu verabreichen und eine quantitative Resorption zu erzielen, wurde die i.p. Injektion an diesen Tagen der oralen Aufnahme der Lactatdiät (Diät-5-) vorgezogen. Da der Harnabsatz möglichst bald nach der Injektion erfolgen sollte, wurde eine osmotische Diurese ausgelöst.

Die Proben wurden 3, 9 und 24 Stunden nach den Injektionen gewonnen und - wie unter 2.3.1 beschrieben - fixiert.

Die Ergebnisse sind für die nicht adaptierten Tiere in Tabelle 13, für die 7 Tage adaptierten Tiere in Tabelle 14 zusammengefaßt. Abbildung 7 gibt den Vergleich der berechneten mittleren stündlichen Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn von adaptierten und nicht adaptierten Tieren wieder.

Der in diesem Periodenversuch angewendete WILCOXON-Test für Paardifferenzen zeigte:

1. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im 24-Stunden-Harn von adaptierten ($\emptyset$ 2,25%) und nicht adaptierten ($\emptyset$ 1,73%) Ratten.
2. Adaptierte Ratten scheiden in den ersten 3 Stunden post injectionem mehr D(-)-Milchsäure aus als nicht adaptierte Ratten ($p \leq 0,05$).

Tabelle 13

Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn von Ratten
nach i.p. Verabreichung von 26,4 mg D(-)-Milchsäure
bei osmotischer Diurese

Ratte Nr.	Körper- gewicht(g)	ausgeschiedene D(-)-MS in % der Verabreichung in der Zeit von:			Gesamt
		0-3h p.i.	3-9h p.i.	9-24h p.i.	
1	286	- ⁺	0,40	1,35	1,76
2	324	0,48	0,30	1,06	1,85
3	318	1,09	0,45	1,51	3,04
4	318	- ⁺	1,23	1,05	2,28
5	356	0,36	0,29	0,96	1,61
6	317	0,45	0,20	0,83	1,48
7	290	0,33	0,38	0,65	1,35
8	340	0,44	0,50	0,62	1,37
9	288	0,41	0,39	0,71	1,52
10	278	0,18	0,28	0,61	1,07
$\bar{x}$	312	0,47	0,44	0,93	1,73
$\pm s$	25	0,27	0,29	0,31	0,56

⁺) kein Harnabsatz

Tabelle 14

Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn von nutritiv adaptierten Ratten nach i.p. Verabreichung von 26,4 mg D(-)-Milchsäure bei osmotischer Diurese

Ratte Nr.	Körper- gewicht(g)	ausgeschiedene D(-)-MS in % der Verabreichung in der Zeit von:			
		0-3h p.i.	3-9h p.i.	9-24h p.i.	Gesamt
1	286	0,50	- ⁺	0,92	1,42
2	324	1,07	0,65	1,05	2,77
3	318	1,68	0,36	0,89	2,93
4	318	1,01	0,62	1,33	2,95
5	356	0,50	0,28	0,89	1,66
6	317	0,47	0,49	1,06	2,03
7	290	0,44	0,28	0,54	1,26
8	340	0,36	0,53	1,00	1,89
9	288	2,01	0,40	0,81	3,22
10	278	0,66	0,28	1,45	2,40
$\bar{x}$	312	0,87	0,43	0,99	2,25
$\pm_s$	25	0,57	0,15	0,26	0,70

⁺) kein Harnabsatz

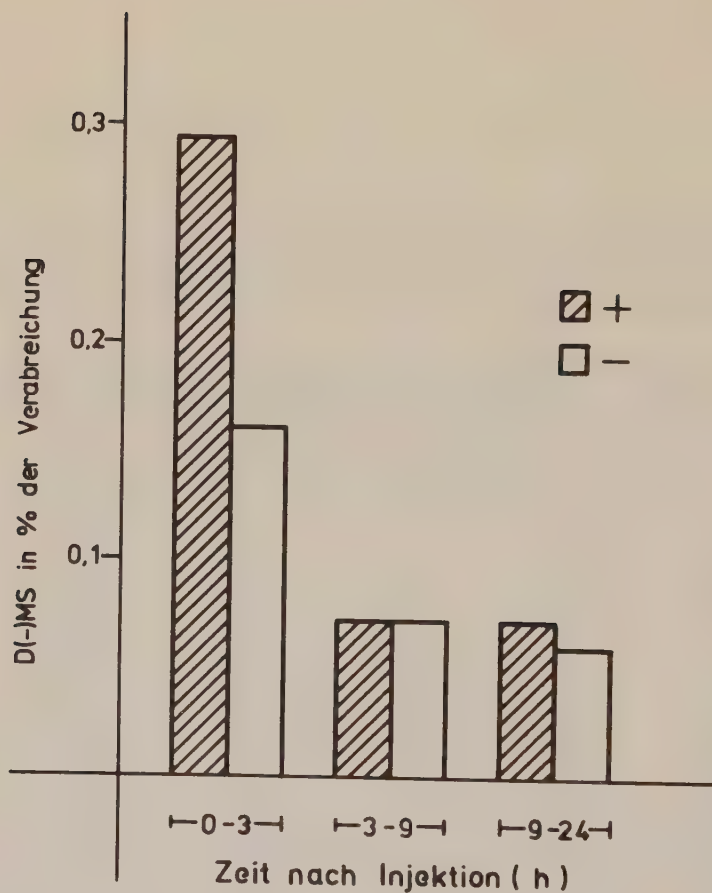


Abb. 7 Berechnete mittlere stündliche Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn
Verabreicht wurden 26,4 mg D(-)MS i.p. an nutritiv adaptierte (+) und nicht adaptierte (-) Ratten

3.4 Metabolisierung von D(-)-Milchsäure in Gewebeschnitten in vitro

Zur vergleichenden Untersuchung der quantitativen Umsetzung von D(-)-Milchsäure wurden 4 Leber- und Zwerchfellschnitte von je 6 Versuchsratten (14 Tage auf Diät -5-) und 6 Kontrollratten (14 Tage auf Diät -0-) 2 Stunden mit D(-)-Milchsäure inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurde der Gehalt der Inkubationslösung an D(-)-Milchsäure bestimmt (Tab.15) und die vom Gewebeschnitt in 2 Stunden eliminierte D(-)-Milchsäure ($\mu\text{g D(-)MS/mg TM}$) berechnet (Tab.16).

Wie Tabelle 15 zeigt, wurde nach 2-stündiger Inkubation ein erheblicher Teil des Substrates wiedergefunden. Die Abweichungen zwischen den Tieren blieben mit Variationskoeffizienten von $\emptyset 5,98 \text{ s\%}$ recht niedrig. Wie aus Tabelle 16 hervorgeht, wurden tatsächlich nur sehr kleine Mengen D(-)-Milchsäure umgesetzt. Ihre Berechnung als Differenzen der in Tabelle 15 angegebenen Gehalte im Medium vor und nach Inkubation bedingte zwangsläufig ganz erhebliche Streuungen. Sieht man davon ab, so lassen sich aus den Mittelwerten zwei Tendenzen herauslesen:

1. Von Leberschnitten wurde in vitro mehr D(-)-Milchsäure aus dem Medium eliminiert als von Zwerchfellschnitten.
2. Beide Gewebe wiesen bei adaptierten Ratten einen höheren Umsatz auf als bei nicht adaptierten.

Eine statistische Sicherung dieser Tendenzen war wegen der hohen Streuungen allerdings nicht zu erzielen. Im Hinblick auf die geringe Größe des Umsatzes von D(-)-Milchsäure arbeitete die hier angewendete Methode offenbar schon im Bereich der Erfassungsgrenze.

Geht man jedoch von den Voraussetzungen aus, daß das Lebergewicht ca. 3 % des Körpergewichtes von Ratten und die Gewebestrockenmasse (TM) ca. 30 % des Frischgewichtes beträgt, dann entspricht z.B. ein Umsatz von ca. $8 \mu\text{g D(-)MS/mg TM/2h}$ einem Gesamtumsatz in der Leber von ca. $25 \text{ mg} / 10 \text{ g Frischgewicht}$ in 2 Stunden. So gesehen erscheint die Metabolisierung von D(-)-Milchsäure im Lebergewebe nicht unerheblich.

Tabelle 15

D(-)-Milchsäuregehalt im Inkubationsansatz vor und nach der Inkubation von Gewebeschnitten mit Na-DL-Lactat in vitro

Behandlung der Ratten	Gewebeschnitt aus dem Organ	µg D(-)MS/Ansatz				
		vor Inkubation		nach Inkubation		
		n	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$
Adaptation	Leber	6	789,85	107,22	696,48	24,53
keine Adaptation	Leber	6	760,90	47,06	735,45	32,73
Adaptation	Zwerchfell	6	740,23	25,42	707,97	24,31
keine Adaptation	Zwerchfell	6	755,20	52,63	736,35	46,39

Tabelle 16

Utilisation von D(-)-Lactat in Geweben von nutritiv adaptierten und nicht adaptierten Ratten bei Inkubation in vitro

Behandlung der Ratten	Gewebeschnitt aus dem Organ	eliminierte D(-)MS in 2 h (µg D(-)MS/mg TM ⁺)		
		n	$\bar{x}$	$\pm s$
Adaptation	Leber	6	8,34	7,74
keine Adaptation	Leber	6	3,34	4,93
Adaptation	Zwerchfell	6	2,50	3,31
keine Adaptation	Zwerchfell	6	1,84	2,56

⁺) Gewebstrockenmasse

3.5 Metabolisierung und Ausscheidung von ^{14}C -D(-)-Milchsäure in vivo

Wie aus dem Versuch 3.3 hervorging, schieden sowohl nutritiv adaptierte wie nicht adaptierte Ratten nach i.p. Verabreichung von D(-)-Milchsäure nur geringe Mengen D(-)-Milchsäure im Harn aus. Folglich wurde D(-)-Milchsäure retiniert und/oder oxydiert und mit der Atemluft ausgeschieden. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde bei nutritiv adaptierten und nicht adaptierten Ratten nach i.p. Injektion von ^{14}C -markierter D(-)-Milchsäure die ^{14}C -Ausscheidung in der Atemluft und im Harn gemessen. In einigen Versuchen wurde nach i.p. Verabreichung von ^{14}C -markierter L(+)-Milchsäure die ^{14}C -Ausscheidung in der Atemluft gemessen.

Im einzelnen sollte der Versuch zeigen, welchen Einfluß die Milchsäurekonzentration auf den Oxydationsverlauf der beiden Milchsäure-Isomere ausübt, und ob die ^{14}C -Ausscheidung in der Atemluft eine Adaptation erkennen läßt. Anhand der enzymatisch im Harn bestimmten und über die Aktivität im Harn berechneten D(-)-Milchsäure sollte geprüft werden, ob D(-)-Milchsäure nur unverändert oder auch in Form C-haltiger Stoffwechselprodukte mit dem Harn ausgeschieden wird. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 8 - 11 und den Tabellen 17 - 20 wiedergegeben.

Vergleicht man die in den Abbildungen 8, 9 und 10 für L(+)- und D(-)-Milchsäure in 3 Milchsäure-Dosierungen dargestellten Ausscheidungskurven von ^{14}C in der Atemluft, so fällt auf, daß die Peak-Höhe von L(+)-Milchsäure in allen Dosierungen über der Peak-Höhe (niedrige Dosierung) bzw. dem Plateau (mittlere und hohe Dosierung) von D(-)-Milchsäure lag. Der Zeitpunkt des Maximums trat für L(+)-Milchsäure immer zwischen 20 und 45 Minuten post injectionem auf, für D(-)-Milchsäure hingegen verschob sich dieser Zeitpunkt mit zunehmender Dosierung von 50 Minuten auf 70 bzw. 80 Minuten p.i. bis zu einer schwankenden Plateau-Bildung 180 Minuten p.i. bei höchster Dosierung. Die Zeit bis zum Abfall auf

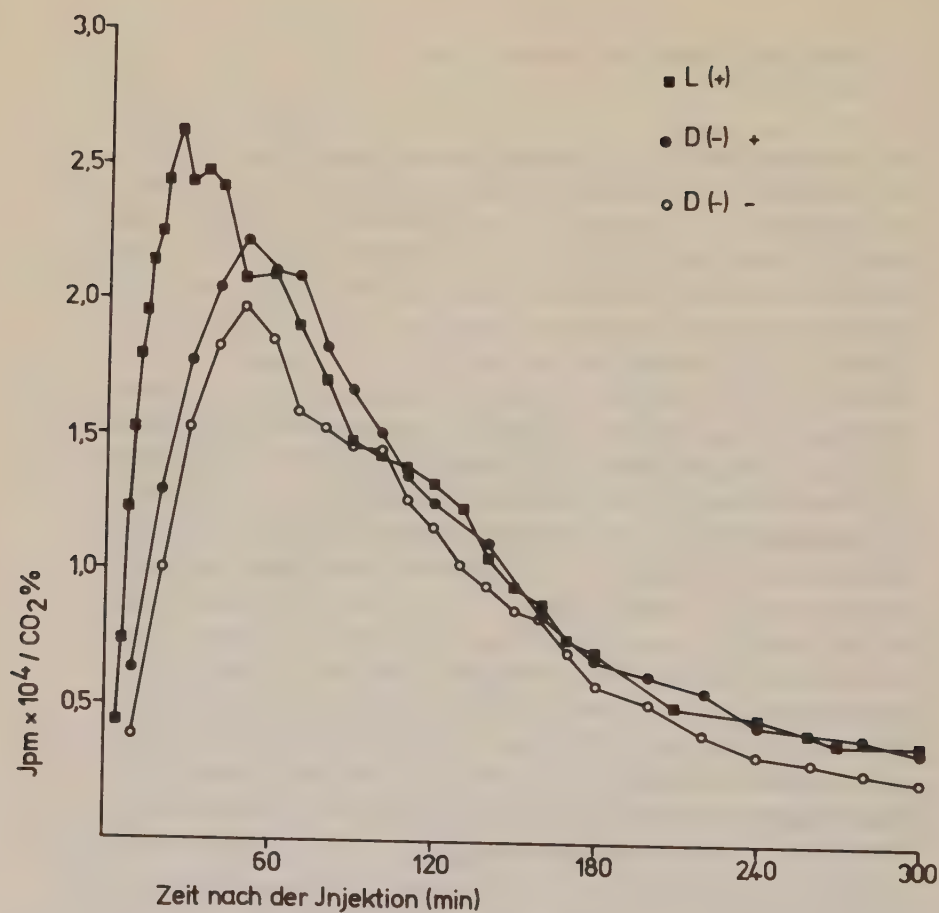


Abb. 8 $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung in der Ausatemluft von Ratten
 Verabreichte Nominaldosis: 0,5 mM ^{14}C -(U)-D(-)-
 Milchsäure bzw. L(+)-MS i.p. mit 5 μCi / kg Kör-
 pergewicht an nutritiv adaptierte (+) und nicht
 adaptierte (-) Ratten

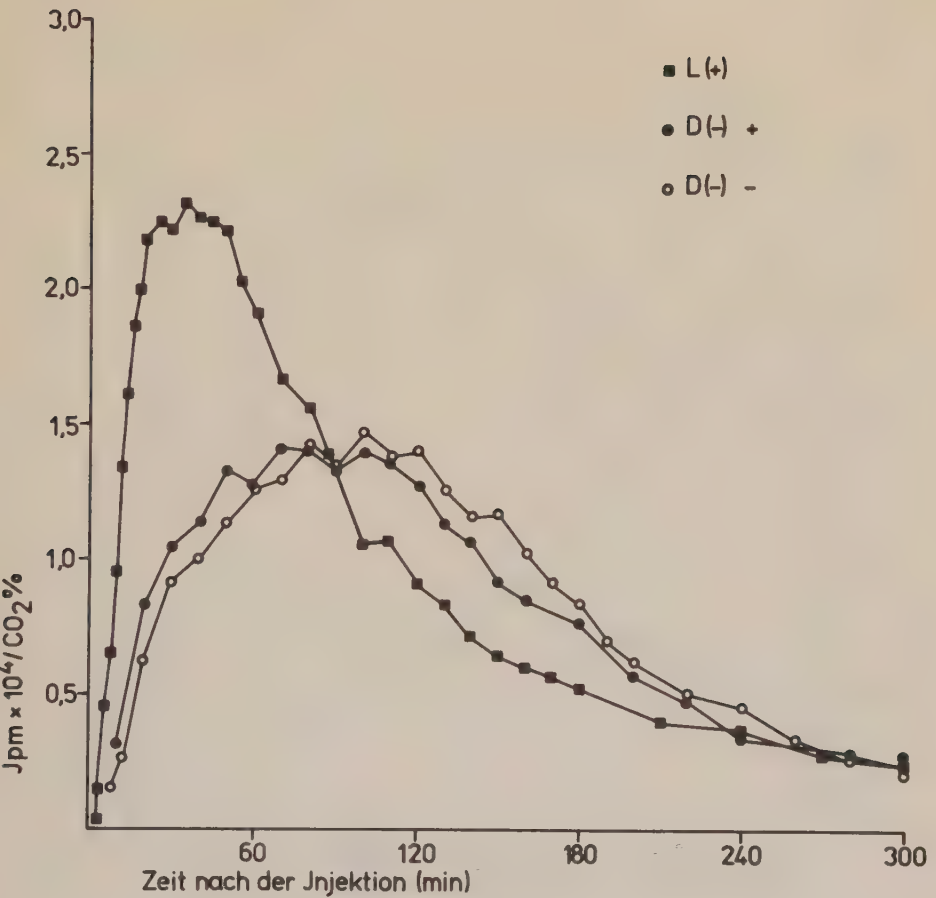


Abb. 9 $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung in der Ausatemluft
Verabreichte Nominaldosis: 2,5 mM ^{14}C -(U)-D(-)-
Milchsäure bzw. L(+)-MS i.p. mit 5 μCi / kg Kör-
pergewicht an nutritiv adaptierte (+) und nicht
adaptierte (-) Ratten

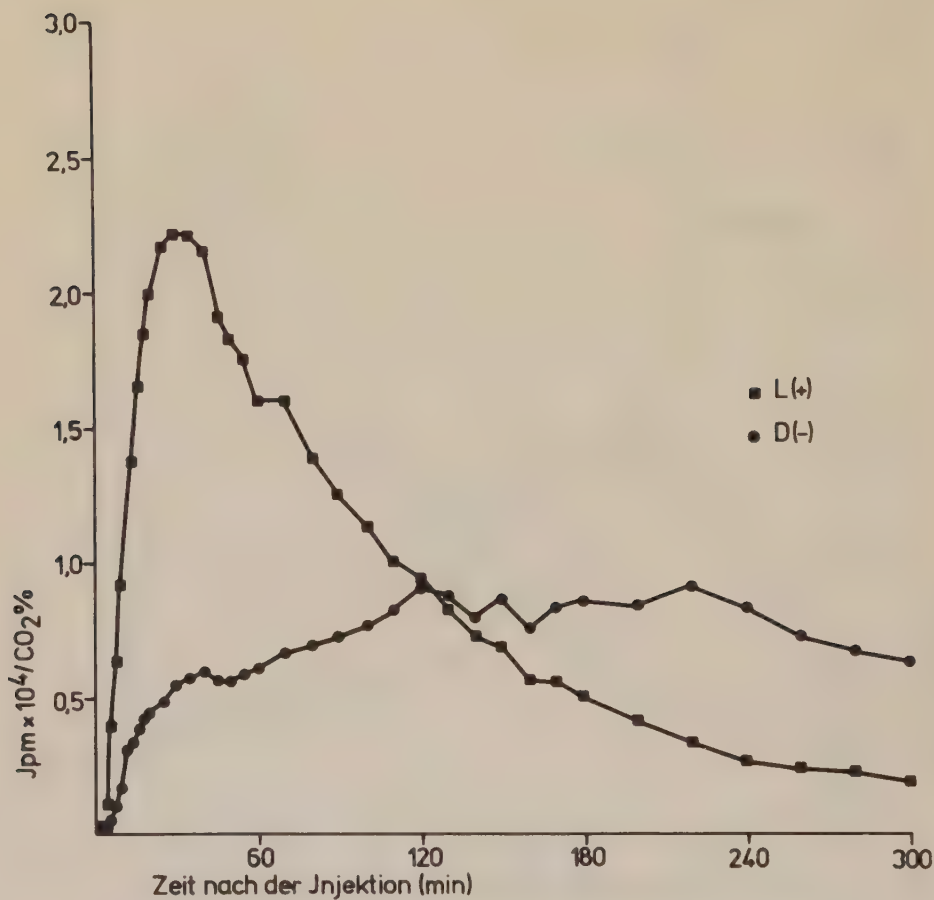


Abb. 10 $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung in der Ausatemluft
 Verabreichte Nominaldosis: 5,0 mM ^{14}C -(U)-D(-)-
 Milchsäure bzw. L(+)MS i.p. mit 5 μCi / kg Körpergewicht

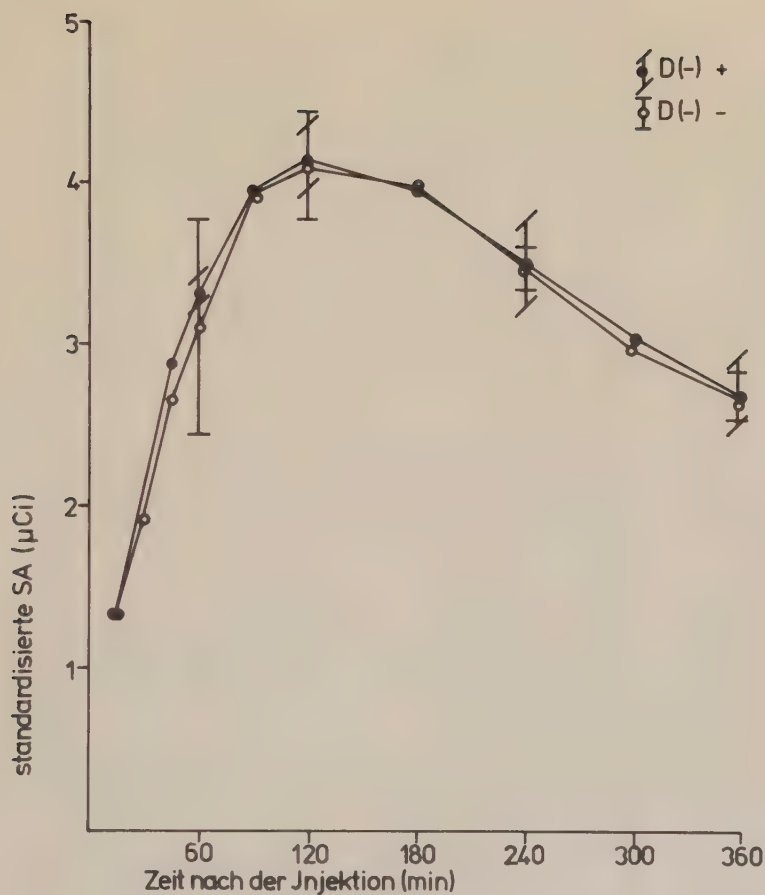


Abb. 11 Standardisierte spezifische Aktivität (SA)
in der Ausatemluft
Verabreichte Nominaldosis: 2,5 mM ^{14}C -(U)-
D(-)-Milchsäure mit 5 μCi / kg Körperge-
wicht
Mittelwerte und Streuungen von je 4 Grup-
pen adaptierter (+) und nicht adaptierter
(-) Ratten

Tabelle 17

Ausscheidung der standardisierten spezifischen Aktivität (SA) und der zu CO₂ und H₂O oxydierten D(-)-Milchsäure in der Ausatemungsluft nach i.p. Injektion von ¹⁴C-(U)-D(-)-Milchsäure bei adaptierten (+) und nicht adaptierten (-) Ratten

D(-)MS-Dosis (mM)		Zeit nach der Injektion (min)			
		60	120	240	360
0,54	standardisierte SA (μCi)	4,85	5,08	3,55	2,66
	oxydierte D(-)MS (mM)	0,77	0,32	0,43	0,47
0,55	standardisierte SA (μCi)	5,17	5,57	4,33	3,36
	oxydierte D(-)MS (mM)	0,15	0,32	0,48	0,55
2,74**	standardisierte SA (μCi)	3,33 ⁺ -0,10	4,16 ⁺ -0,20	3,49 ⁺ -0,26	2,69 ⁺ -0,60
	oxydierte D(-)MS (mM)	0,51	1,23	1,96	2,23
2,92**	standardisierte SA (μCi)	3,12 ⁺ -0,72	4,10 ⁺ -0,37	3,48 ⁺ -0,14	2,68 ⁺ -0,19
	oxydierte D(-)MS (mM)	0,49	1,24	2,02	2,30
5,88	standardisierte SA (μCi)	1,53	2,04	2,50	2,38
	oxydierte D(-)MS (mM)	0,45	1,15	2,78	4,01

**) Mittelwert der in Tabelle 20 angegebenen Dosierung

Tabelle 18

^{14}C -Bilanz von Versuchsgruppen zu je 3 Ratten 6 Stunden nach i.p. Verabreichung von ^{14}C -D(-)-Milchsäure

Versuchsgruppe Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
adaptiert (+)											
nicht adaptiert(-)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
$\mu\text{Ci } ^{14}\text{C/kg}$											
verabreicht	5,40	5,46	4,97	5,22	5,15	5,45	5,99	5,64	5,71	5,45	5,88
exhaliiert	4,73	5,45	4,06	4,41	4,40	4,72	4,80	4,74	4,56	4,51	4,01
exkretiert	- ^{*)}	0,0061	0,162	0,086	0,421	0,249	0,724	0,540	0,996	0,399	0,507
ausgeschieden	4,73	5,4561	4,222	4,496	4,821	4,969	5,524	5,280	5,556	4,901	4,517
retiniert	0,67	0,0039	0,748	0,724	0,329	0,481	0,466	0,360	0,154	0,541	0,363

^{*)} kein Harnabsatz

Tabelle 19

Ausscheidung von D(-)- und L(+)-Milchsäure im Harn bei Gruppen von je 3 Ratten
6 Stunden nach i.p. Verabreichung von ^{14}C -D(-)-Milchsäure

Versuchsgruppe Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
adaptiert (+)											
nicht adaptiert (-)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
mM MS/kg											
verabreichte D(-)MS	0,54	0,55	2,48	2,62	2,64	2,82	3,00	2,81	2,84	2,72	5,88
ausgeschiedene D(-)MS	*	0,0009	0,033	0,016	0,099	0,074	0,125	0,100	0,186	0,074	0,284
ausgeschiedene L(+)MS	*	0,001	0,009	0,031	0,054	0,033	0,030	0,034	0,037	0,061	0,040

*) kein Harnabsatz

Tabelle 20

Oxydation, Ausscheidung und Retention von D(-)-Milchsäure bei Gruppen von je 3 Ratten
6 Stunden nach i.p. Verabreichung von ^{14}C -D(-)-Milchsäure

Versuchsgruppe Nr. adaptiert nicht adaptiert(-)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
verabreicht (mM/kg)	0,54	0,55	2,48	2,62	2,64	2,82	3,00	2,81	2,84	2,72	5,88
in % der Verabreichung											
exhaliert	87,0	100,0	81,8	84,3	85,2	86,1	80,0	84,3	80,5	83,0	88,1
als D(-)MS im Harn	·*	0,2	1,4	0,7	4,2	3,2	5,2	4,3	8,0	3,3	6,1
als Stoffwechsel- produkte im Harn	·*	0,0	1,9	1,0	4,0	1,4	6,7	5,5	9,3	4,3	2,5
Gesamt-Ausscheidung	87,0	100,2	85,1	86,0	93,4	90,7	91,9	89,1	97,8	90,6	96,7
Retention	13,0	0,0	14,9	14,0	6,6	9,3	8,1	10,9	2,2	9,4	3,3

*) kein Harnabsatz

den 1/2-fachen Maximalwert betrug für L(+)-Milchsäure in allen Dosierungen 105 - 120 Minuten, für D(-)-Milchsäure jedoch mit steigender Dosierung 140, 185 und 300 Minuten. Diese Vergleiche zeigen, daß D(-)-Milchsäure im Gegensatz zu L(+)-Milchsäure mit höherer Dosierung zunehmend langsamer umgesetzt wurde.

Die aus Abbildung 8 und 9 zu ersiehende geringgradig langsamere Ausscheidung von ^{14}C (Imp/% CO_2) in der Atemluft nicht adaptierter Tiere liegt wohl darin begründet, daß diese Kurven nicht die standardisierte spezifische Aktivität darstellen.

In Abbildung 11 sind daher die aus je 4 Gruppen adaptierter und nicht adaptierter Ratten gemittelten standardisierten spezifischen Aktivitäten in der Atemluft nach i.p. Applikation von ^{14}C -D(-)-Milchsäure in mittlerer Dosierung als Kurven dargestellt. Der Verlauf der Kurven zeigte sowohl für adaptierte wie nicht adaptierte Tiere einen steilen Anstieg mit dem Maximum bei 120 Minuten, sodann einen langsamen Abfall; das Ausscheidungsmaximum der standardisierten spezifischen Aktivität unterschied sich bei adaptierten und nicht adaptierten Tieren nur unwesentlich. Anhand des zeitlichen Verlaufes und der Höhe der ^{14}C -Ausscheidung in der Atemluft ließ sich keine Adaptation erkennen.

Tabelle 17 gibt die standardisierte spezifische Aktivität sowie die als D(-)-Milchsäure berechnete Ausscheidung von ^{14}C in der Atemluft von adaptierten und nicht adaptierten Tieren nach Verabreichung von D(-)-Milchsäure in 3 Dosierungen wieder. Zwischen adaptierten und nicht adaptierten Tieren bestanden keine nennenswerten Differenzen. Für die unterschiedlichen Dosierungen jedoch ergaben sich erhebliche Differenzen:

Adaptierte Tiere schieden z.B. 60 Minuten p.i. bei niedriger Dosierung 0,17 mM oxydierte D(-)-Milchsäure aus, bei mittlerer d.h. ca. 5-fach höherer Dosierung 0,51 mM (3-fache Steigerung der Oxydation) und bei hoher, d.h. ca. 10-fach

höherer Dosierung nur 0,45 mM (keine weitere Steigerung der Oxydation); 360 Minuten p.i. waren die Differenzen unerheblich. Das heißt mit steigender Dosierung verzögerte sich die Oxydation von D(-)-Milchsäure, war jedoch nach 360 Minuten etwa gleich.

Um die Gesamtausscheidung von ^{14}C zu berücksichtigen und eine Berechnung der Retention zu ermöglichen, wurde die in Tabelle 18 wiedergegebene ^{14}C -Bilanz aufgestellt. Daraus geht folgendes hervor:

1. Der Hauptanteil wurde als CO_2 exhaliiert. Im Harn wurden zwischen 0 (Versuchsgruppe 1) und 17,4 % (Versuchsgruppe 9) ausgeschieden.
2. Die ^{14}C -Retention, berechnet als Differenz zwischen der verabreichten und ausgeschiedenen Aktivität, lag zwischen 0,071 % (Versuchsgruppe 2) und 15,0 % (Versuchsgruppe 3).

Diese Ergebnisse mögen im Hinblick auf die Ausscheidung im Harn insofern zu unrichtigen Vorstellungen führen, als ^{14}C -Aktivität auch in anderer Form als D(-)-Milchsäure im Harn erscheinen kann. Darum wurden im 6-Stunden-Harn der einzelnen Versuchsgruppen enzymatische Bestimmungen von D(-)- und L(+)-Milchsäure durchgeführt, deren Ergebnisse Tabelle 19 zeigt.

Aus den in den Tabellen 18 und 19 wiedergegebenen Messungen läßt sich dann die oxydierte, ausgeschiedene und retinierte D(-)-Milchsäure wie in Tabelle 20 berechnen. Daraus geht hervor:

1. D(-)-Milchsäure wurde zu 80 - 100 % zu CO_2 und H_2O oxydiert und in der Atemluft ausgeschieden.
2. Im Harn schieden die Tiere 0 - 8 % der verabreichten Dosis als D(-)-Milchsäure aus. Abgesehen von diesen Extremwerten lag die durchschnittliche Ausscheidung der anderen Gruppen bei 3,2 %.

3. Im Harn wurden außerdem 0 - 9,3 % der verabreichten D(-)-Milchsäure in anderer Form ausgeschieden. L(+)-Milchsäure dürfte davon (nach Tab.19) nur einen geringen Anteil ausmachen.
4. Die Gesamtausscheidung von D(-)-Milchsäure einschließlich der Stoffwechselprodukte ergab sich zu 85 - 100 % und die Retention zu 0 - 14,9 % der verabreichten Dosis. Eine Abhängigkeit von der verabreichten Menge D(-)-Milchsäure war nicht erkennbar.
5. An der Gesamtausscheidung von D(-)-Milchsäure ließ sich keine Adaptation erkennen. Es fiel hingegen auf, daß adaptierte Tiere in der Atemluft etwas weniger, andererseits im Harn mehr D(-)-Milchsäure ausscheiden als nicht adaptierte Tiere. Diese Tendenzen konnten jedoch aufgrund der sehr kleinen Unterschiede in der Ausscheidung und der relativ großen Streuungen statistisch nicht gesichert werden.
6. Insgesamt ergab sich - von der niedrigsten Dosis abgesehen - kein deutlicher Einfluß der verabreichten Menge D(-)-Milchsäure auf Art und Anteil der Ausscheidung bzw. Retention. Die Streuungen mögen hauptsächlich von der Harnausscheidung beeinflußt worden sein.

4. DISKUSSION

Die klassischen Versuche von CORI u. CORI (1929) zeigten, daß D(-)-Milchsäure vom tierischen Organismus nicht zur Glucosebildung verwendet und zum großen Teil im Harn unverändert ausgeschieden wird. Nach späteren Untersuchungen anderer Autoren wird das "unphysiologische" Milchsäure-Isomer, die D(-)-Milchsäure, zwar in wechselndem Maße metabolisiert, jedoch wesentlich geringer als das L(+)-Isomer. Neue methodische Entwicklungen, insbesondere eine enzymatische Bestimmungsmethode für D(-)-Milchsäure und die ^{14}C -Exhalationsradiometrie, bildeten die Voraussetzung für die zusammenhängende Bearbeitung der Resorption, Ausscheidung und Metabolisierung von D(-)-Milchsäure in der vorliegenden Studie.

4.1 Resorption und Ausscheidung

Nach oraler (physiologischer) Verabreichung von D(-)-Milchsäure wurde - im Einklang mit den Beobachtungen der in Tabelle 1 genannten Autoren - D(-)-Milchsäure aus dem Magen-Darm-Trakt rasch resorbiert. Da Milchsäure nach bisherigen Kenntnissen nicht aktiv resorbiert wird und auch das D(-)-Isomer spontan im Pfortaderblut anflutet, liegt es nahe, daß der Übertritt nicht nur durch die Darmschleimhaut sondern auch durch die Magenschleimhaut erfolgte. Die in den Tabellen 10 und 11 aufgeführten Ergebnisse zeigen nicht nur, daß D(-)- und L(+)-Milchsäure gleich schnell resorbiert werden, sondern sie weisen auch darauf hin, daß D(-)-Milchsäure schon innerhalb von 120 - 180 Minuten aus dem Blut eliminiert und somit wohl in erheblichem Umfange ausgeschieden und/oder metabolisiert wurde.

Eine vergleichende Zusammenstellung der bisher bekannt gewordenen Daten über die Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn gibt Tabelle 21.

Tabelle 21

Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn von Ratten in % der verabreichten Dosis

Verabreichte Dosis mg/kg Körpergewicht	Art der Verabreichung	Ausscheidung in % der Dosis 3 - 6 h bzw. 24 h p.appl.	Autoren
50	i.p.	0,2	diese Arbeit
85	i.p. +	0,5 (0,9) ++	diese Arbeit
249	i.p.	2,9 (4,7)	diese Arbeit
490	mit dem Futter	-	diese Arbeit
529	i.p.	1,6 (1,2)	diese Arbeit
658	per Sonde	23	MEDZIHRADESKY u. LAMPRECHT (1966)
1 700	per Sonde	29	CORI u. CORI (1929)

+) bei osmotischer Diurese
 ++) nutritiv adaptierte Tiere (...)

Die in eigenen Untersuchungen ermittelte Harnausscheidung von D(-)-Milchsäure war beträchtlich niedriger, als von CORI u. CORI (1929) sowie MEDZIHRADSKY u. LAMPRECHT (1966) berichtet wurde. Diese unterschiedlichen Ergebnisse mögen zum Teil auf methodische Probleme der spezifischen und empfindlichen Bestimmung von D(-)-Milchsäure zurückzuführen sein, wie sie sich aus der polarimetrischen Messung (CORI u. CORI, 1929) und dem kolorimetrisch-enzymatischen Differenzverfahren (MEDZIHRADSKY u. LAMPRECHT, 1966) ergeben. Schon 1963 haben LUNDHOLM et al. diese Methoden als relativ ungeeignet bezeichnet, wenngleich zu jener Zeit kaum bessere Verfahren zur Verfügung standen. Die besondere Neigung von Milchsäure, in konzentrierter Lösung Polymere zu bilden (HOLTON, 1971), die dann im Stoffwechsel dem enzymatischen Abbau entgehen, mag in früheren Untersuchungen ebenfalls eine Rolle gespielt haben. In den eigenen Versuchen konnten jedenfalls isomerenreine Lösungen von geringer Konzentration verwendet werden.

In wieweit das Alter der Tiere auf die Ausscheidung Einfluß nimmt, muß dahin gestellt bleiben. Zwar wiesen die Tiere von CORI u. CORI (1929) nur 100 g Körpergewicht auf, erhielten aber auch eine ausnehmend hohe Dosis. Nach dem Gewicht zu urteilen, waren die von MEDZIHRADSKY u. LAMPRECHT (1966) verwendeten Tiere mit den eigenen ungefähr altersgleich. Immerhin wird von menschlichen Säuglingen eine höhere Ausscheidung von D(-)-Milchsäure als von Erwachsenen berichtet (DROESE u. STOLLEY, Zitat nach REHBINDER, 1971). Entsprechendes dürfte nur für sehr junge Ratten zutreffen.

D(-)-Milchsäure wurde in den ersten 3 Stunden nach Applikation vermehrt ausgeschieden (s. Abb. 7), was im zeitlichen Verlauf den Beobachtungen von MEDZIHRADSKY u. LAMPRECHT (1966) entspricht. Verglichen mit dem Verlauf der Anflutung von D(-)-Milchsäure im Blut mit einem Maximum 90 Minuten nach Applikation, wurde D(-)-Milchsäure sehr rasch ausgeschieden. Zwar liegen keine Untersuchungen über die Aus-

scheidung von D(-)-Milchsäure im Harn 60 und 120 Minuten nach Applikation vor, doch läßt der Abfall der Konzentrationsdifferenzen von D(-)-Milchsäure in Pfortader und Aorta darauf schließen, daß das Maximum der Harnausscheidung nach 180 Minuten bereits überschritten war.

Ein besonderer Einfluß auf die Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn könnte der Größe und der Applikation der Dosis zugeschrieben werden. So lassen die in Tabelle 21 zusammengefaßten Daten deutlich erkennen, daß bei hoher Dosierung mehr ausgeschieden wird als bei geringer. Allerdings erzielten CORI u. CORI (1929) und MEDZIHRADESKY u. LAMPRECHT (1966) vergleichbare Ausscheidungen bei sehr unterschiedlicher Dosierung. Andererseits ist die von MEDZIHRADESKY u. LAMPRECHT (1966) angewendete Dosis von der Höchstmenge in den eigenen Versuchen nicht so verschieden, daß eine derartige Differenz in der Ausscheidung zu erwarten wäre. Tatsächlich trat bei i.p. Applikation bei 8 Gruppen zu je 3 Tieren, die alle eine mittlere Dosis von 250mg/kg Körpergewicht erhielten (vgl.Tab.20), eine erhebliche Variation zu Tage: Die Ausscheidung im Harn betrug hier 0,7 - 8 % der Dosis. Demnach dürfte die Höhe der Exkretion von D(-)-Milchsäure außer von der verabreichten Menge auch von anderen Faktoren maßgeblich beeinflußt werden.

Die Art der Verabreichung war sicherlich insofern von Einfluß, als die Injektion in die Bauchhöhle zu rascherer Resorption führte als eine perorale Gabe und bei höherer i.p. Dosis von mit NaOH neutralisierter D(-)-Milchsäure ein diuretischer Effekt des Natriums die Harnausscheidung erhöht haben dürfte. Die bei Gaben von 490 mg / kg mit dem Futter und von 529 mg / kg i.p. gefundenen Werte im Harn (vgl. Tab.21) sprechen für diesen Schluß. Um so überraschender ist es, daß die Verabreichung mit der Sonde (MEDZIHRADESKY u. LAMPRECHT, 1966) eine so wesentlich erhöhte Ausscheidung im Harn erbrachte.

Eine zusätzliche Exkretion von D(-)-Milchsäure mit dem Schweiß oder Sekretion in den Darmtrakt ist nicht auszuschließen, wurde aber in den eigenen wie in den Versuchen anderer Autoren vernachlässigt.

Insgesamt betrachtet haben die Untersuchungen von CORI u. CORI (1929) und von MEDZIHRADSKY u. LAMPRECHT (1966) zu der verallgemeinerten Schlußfolgerung geführt (REHBINDER, 1971), daß D(-)-Milchsäure zu etwa 30 % im Harn ausgeschieden wird. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit trifft das aber bestenfalls für die Verabreichung von sehr hohen Mengen zu, welche die hier verabfolgte Höchstdosis von rund 0,5 g / kg bei weitem übersteigen.

4.2 Metabolisierung und Retention

Die von einigen Autoren (Tab.2) erhobenen Befunde über die Metabolisierung von D(-)-Milchsäure in vitro dienten hauptsächlich einem relativen Vergleich der beiden Milchsäure-Isomere. Es wurde gezeigt, daß D(-)-Milchsäure in tierischen Geweben in geringerem Maße umgesetzt wird als L(+)-Milchsäure. In eigenen Versuchen zur Metabolisierung von D(-)-Milchsäure in vitro (L(+)-Milchsäure wurde nicht untersucht) in Leber- und Zwerchfellgewebe der Ratte wurden nur kleine Mengen der angebotenen D(-)-Milchsäure eliminiert. Trotzdem ergibt eine Umrechnung auf das Lebergewicht - wie sie zu Vergleichszwecken zulässig erscheinen mag - eine Metabolisierung von 25 mg D(-)-Milchsäure in 2 Stunden. Das würde allein in der Leber einem Tagesumsatz von 300 mg entsprechen. Tatsächlich wurde von Ratten in Versuchen mit steigender Dosis ^{14}C -D(-)-Milchsäure in vivo in 6 Stunden bis zu 120 mg D(-)-Milchsäure umgesetzt (vgl.Tab.17).

Die enzymatischen Voraussetzungen scheinen bei Ratten besonders in der Leber gegeben zu sein. So hat CAMMACK (1969) in verschiedenen Geweben (vgl.Tab.4) gerade in der Leber der Ratte eine gegenüber anderen Organen relativ hohe Enzymakti-

vität nachgewiesen. Allerdings ergaben sich gerade in dieser Hinsicht tierartspezifische Unterschiede, denn beim Kaninchen lag die höchste Enzymaktivität im Nierengewebe vor. Bei Untersuchungen von HINKSON et al. (1967) über den Lactatstoffwechsel in der Leber von Ratte und Schaf zeigte sich, daß Lebergewebe von Ratten D(-)-Milchsäure in erheblich größerem Umfang (7-14 %) umsetzte als das von Schafen (0-5 %). Übereinstimmend mit diesem Unterschied fand CAMMACK (1969) in der Leber von Ratten eine rund 3-fach höhere Aktivität der D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase als in der Leber von Wiederkäuern. Die Gründe für diese tierartigen Unterschiede sind bisher unbekannt, und ihre Klärung bedarf sicher quantitativer Methoden, um die Metabolisierung von Milchsäureisomeren in vivo zu messen.

Für derartige Untersuchungen bietet die ^{14}C -Exhalationsradiometrie, wie sie in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam, beste Voraussetzungen. Wie die unter 3.5 dargestellten Ergebnisse zeigen, wurde D(-)-Milchsäure in hohem Maße der Endoxydation zugeführt und der ^{14}C -markierte Kohlenstoff innerhalb 6 Stunden zu 80 - 100 % als $^{14}\text{CO}_2$ in der Ausatemungsluft ausgeschieden. Abgesehen davon, daß bei der niedrigsten Dosierung von D(-)-Milchsäure innerhalb 6 Stunden eine maximal 100 %ige Oxydation erfolgte, ergab sich bei den höheren Applikationen kein deutlicher Einfluß auf den als CO_2 ausgeschiedenen Anteil.

Im Unterschied zu L(+)-Milchsäure zeigte sich aber bei der höchsten Dosis von D(-)-Milchsäure eine deutliche Verzögerung der Oxydation (vgl.Tab.17). Auf solche relativen Differenzen zwischen den Milchsäure-Isomeren hatten schon die Versuche von BRIN (1964) hingewiesen, doch heben die eigenen Befunde diesen Unterschied auch in quantitativer Hinsicht hervor. Die Ursache für diese Verzögerung könnte in einer Hemmung der D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase durch Substratüberschuß zu suchen sein.

Trotz mit zunehmender Dosierung von D(-)-Milchsäure verzögerter Oxydation wurde binnen 120 Minuten p.i. (bei niedriger Dosis) bzw. 240 Minuten p.i. (bei mittlerer und hoher Dosis) mehr als 50 % der verabreichten D(-)-Milchsäure als CO_2 mit der Atemluft ausgeschieden (Tab.17). Ein Vergleich mit der Anflutung von D(-)-Milchsäure im Blut nach oraler Verabfolgung (Tab.10 u. Abb.4) läßt darauf schließen, daß auch die auf physiologischem Wege aufgenommene D(-)-Milchsäure rasch zur Oxydation gelangt und somit zur Energiegewinnung genutzt wird. Wie zuvor erörtert, dürfte bei der Ratte die Leber hauptsächlich für diese Oxydation von D(-)-Milchsäure verantwortlich sein. Die von SCHIMASSEK (1965) beobachtete fast gleiche Oxydation von D(-)- und L(+)-Milchsäure in perfundierter Rattenleber in vitro deutete bereits auf die zentrale Stellung dieses Organs im Stoffwechsel von D(-)-Milchsäure hin. In Anbetracht der weitgehenden Oxydation von D(-)-Milchsäure ist es nicht überraschend, daß ein Teil der ^{14}C -Aktivität auch in anderer Form als D(-)-Milchsäure im Harn ausgeschieden wurde. Ein Eintritt von $^{14}\text{CO}_2$ in die ebenfalls in der Leber ablaufende Harnstoffsynthese erscheint dabei durchaus naheliegend. Da eine Identifizierung solcher ^{14}C -haltiger Metaboliten im Harn unterblieb, L(+)-Milchsäure aber in geringem Prozentsatz gefunden wurde (Tab.19), kann eine intermediäre Racemisierung von D(-)- zu L(+)-Milchsäure (HUENNEKENS et al., 1951) nicht ausgeschlossen werden.

Die Gesamtausscheidung von D(-)-Milchsäure einschließlich der Stoffwechselprodukte ergab eine Retention von 0 - 14,9 % der verabreichten Dosis (Tab.20). Allerdings kann hier nur von einer "relativen" Retention ausgegangen werden, weil die Versuche nur über 6 Stunden liefen. In Form welcher Metaboliten die nicht ausgeschiedene ^{14}C -Aktivität retiniert wurde, geht aus eigenen Versuchen nicht hervor. Gegen einen Einbau in Glucose sprechen die Befunde von CORI u. CORI (1929) und HOBERTMAN u. D'ADAMO (1960). CAMMACK (1969) hat indessen gezeigt, daß D(-)-Milchsäure von D-2-Hydroxysäuren-

Dehydrogenase zu Pyruvat oxydiert wird, einer potentiellen Vorstufe für die Gluconeogenese. Da es sich bei diesem Enzym um ein mitochondriales Flavinenzym handelt (CAMMACK, 1969), die Gluconeogenese aber im cytoplasmatischen Raum abläuft, dürfte die Kompartimentierung der Zelle dafür verantwortlich sein, daß D(-)-Milchsäure nicht zur Glucosebildung herangezogen werden kann.

4.3 Adaptation

In allen früheren Untersuchungen anderer Autoren war die Frage nach einer Adaptation an den Stoffwechsel von D(-)-Milchsäure unberücksichtigt geblieben. So erschien es naheliegend, die eigenen Versuche auch an Ratten durchzuführen, die D(-)-Milchsäure über längere Zeit mit dem Futter erhalten hatten. Wie aus den diesbezüglichen Ergebnissen hervorgeht (vgl.Tab.20), führte eine derartige nutritive Adaptation zu keiner signifikanten Erhöhung der Oxydation von D(-)-Milchsäure. Demgegenüber ergab sich für solche Tiere im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren innerhalb der ersten 3 Stunden eine etwas höhere Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn (Tab.13,14; Abb.7). Dieser Unterschied ist zwar nur in den ersten 3 Stunden mit $p \leq 0,05$ zu sichern, er weist aber auf die Möglichkeit hin, daß sich die Niere zur Zeit der maximalen Konzentration von D(-)-Milchsäure im Blut an eine vermehrte Ausscheidung anpaßt.

Die hier diskutierten Ergebnisse zeigten, daß D(-)-Milchsäure vom tierischen Organismus zum weitaus größten Teil zur Energiegewinnung genutzt wird und nur in sehr geringem Umfang den Körper unverändert über den Harn verläßt. Sicher kann damit D(-)-Milchsäure, die von der Darmflora erzeugt und resorbiert wurde oder dem Aminoaceton-Zyklus entstammt, energetisch verwertet und aus dem Stoffwechselsystem beseitigt werden, ohne daß es dafür einer besonderen Anpassung bedarf.

Wie eingangs erörtert wurde, kann darüber hinaus auch mit der Nahrung D(-)-Milchsäure neben L(+)-Milchsäure aufgenommen werden. So enthalten z.B. Sauermilchprodukte 0,6 - 0,9 g DL-Lactat / 100 g (SCHALL, 1962), also bei annähernd gleichen Anteilen von L(+)- und D(-)-Milchsäure im DL-Lactat ca. 0,3 - 0,45 % D(-)-Milchsäure. Im Vergleich dazu wurde in den eigenen Fütterungsversuchen (3.2) mit 5 %iger Lactatdiät eine recht hohe Zufuhr von D(-)-Milchsäure erreicht, die trotzdem nur zu minimaler Ausscheidung führte. So wird auch ein hoher Gehalt von D(-)-Milchsäure in der Nahrung energetisch weitgehend genutzt und dürfte in dieser Hinsicht durchaus vertretbar erscheinen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

An Ratten, die eine DL-lactathaltige Diät oder eine lactatfreie Kontrolldiät erhielten, wurde nach oraler und intraperitonealer Verabreichung von D(-)-Milchsäure ihre Exkretion im Harn, die Oxydation und Ausscheidung als CO_2 in der Expirationsluft und die Utilisation durch Gewebeschnitte von Leber und Zwerchfell in vitro unter Berücksichtigung der nutritiven Adaptierbarkeit untersucht. Die Bestimmung von D(-)-Milchsäure erfolgte mit einer spezifischen enzymatischen Methode und die Messung der Oxydationsrate mittels ^{14}C -Exhalationsradiometrie. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Anflutung von D(-)-Milchsäure im Blut der Pfortader und Aorta erfolgte rasch und im zeitlichen Verlauf wie beim L(+)-Isomer mit einem Konzentrationsmaximum von 90 Minuten.
2. Nach Aufnahme von 490 mg D(-)-Milchsäure / kg Körpergewicht (G) mit dem Futter wurden innerhalb 24 h 1,6 % der aufgenommenen Menge im Harn ausgeschieden. Eine Adaptation war nicht erkennbar.
3. Nach i.p. Applikation von 50 - 529 mg / kg G erschienen im Harn 0 - 8 %, im Mittel 3,3 %, der verabreichten Menge innerhalb 6 h. Im Harn wurden neben D(-)-Milchsäure 0 - 9,3 % der verabreichten Menge in Form C-haltiger Stoffwechselprodukte ausgeschieden.
4. Gewebeschnitte von Leber und Zwerchfell in vitro setzten D(-)-Milchsäure mit einer mittleren Rate von 5,3 bzw. 2,2 μg / mg Gewebstrockenmasse in 2 h um.
5. Nach i.p. Applikation von ^{14}C -(U)-D(-)-Milchsäure wurden 80 - 100 % innerhalb 6 h oxydiert und in der Expirationsluft ausgeschieden. Mit zunehmender Dosis machte sich gegenüber dem L(+)-Isomer eine deutliche Verminderung der Oxydationsrate bemerkbar.

6. Bis zu 6 h p.i. wurden 0 - 15 %, im Mittel 8,3 %, der als D(-)-Milchsäure berechneten Aktivität weder im Harn noch in der Expirationsluft ausgeschieden und als Retention berechnet.
7. Zwischen mit Lactatdiät und lactatfreier Diät gefütterten Ratten traten keine signifikanten Unterschiede in der Oxydationsrate und Gesamtausscheidung von D(-)-Milchsäure auf. Tiere der erstgenannten Gruppe schieden innerhalb 3 h nach i.p. Applikation von D(-)-Milchsäure einen höheren Anteil ($p \leq 0,05$) im Harn aus.

SUMMARY

In the above described experiments rats were fed a diet with D,L-lactate or a lactate-free control diet. After oral or intraperitoneal application of D(-)lactate its excretion and its oxidation and exspiration as carbon dioxide as well as the utilization in vitro of D(-)lactate by slices of liver-tissue and diaphragm were investigated with regard to nutritive adaptability. D(-)lactic acid was determined by a specific enzymatic method and the oxidation rate by means of ^{14}C -exhalation radiometry. The following results were obtained:

1. A rapid appearance of D(-)lactate was observed in the blood of portal vein and aorta which was temporary similar to the L(+)isomer with a concentration maximum at 90 min.
2. After a dietary intake of 490 mg D(-)lactate per kg of weight (W) 1.6 % of the amount ingested were excreted in urine over a period of 24 h. No adaptation was observed.
3. After i.p. application of 50 - 529 mg per kg W 0 - 8 % (average 3.3 %) of the dosis appeared in the urine. In addition to D(-)lactate 0 - 9.3 % of the applied amount were excreted as carbon containing metabolites.
4. Tissue slices of liver and diaphragm in vitro utilized D(-)lactate at a mean rate of 5.3 and 2.2 μg / mg tissue dry matter within 2 h, respectively.
5. After i.p. application of ^{14}C -(U)-D(-)lactate 80 - 100 % were oxidized and exhaled within 6 h. With increasing doses a reduction of oxidation rate as compared to the L(+)isomer was noted.
6. Up to 6 h p.i. 0 - 15 % (average 8.3 %) of the ^{14}C -activity calculated as D(-)lactate were not excreted in urine and respiration and were thus calculated as retention.

7. Between rats fed the lactate-containing and lactate-free diets no significant difference in the rate of oxidation and in total excretion of D(-)lactate were observed. Animals of the former group excreted a higher amount ($p \leq 0.05$) within 3 h after i.p. application.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Bancroft, W.D. u. H.L. Davis, 1931
The optical rotation of lactic acid.
J. biol. Chem., 35, 2508
- Barker, S.B. u. W.H. Summerson, 1941
The colorimetric determination of lactic acid in
biological material.
J. biol. Chem., 138, 535
- Bergey, 1957
Determinative bacteriology, Hrsg.: R.S. Breed,
E.G.D. Murray u. N.R. Smith
The Williams & Wilkins Company, Baltimore
- Brin, M., R.E. Olson u. F.J. Stare, 1952
Metabolism of cardiac muscle.
V. Comparative studies with L(+)- and D(-)-¹⁴C-
lactate in duck and rat tissues.
J. biol. Chem., 199, 467
- Brin, M., 1964
Synthesis and metabolism of lactic acid isomers.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 119, 942
- Buddecke, E., 1971
Grundriss der Biochemie.
Walter de Gruyter & Co., Berlin
- Cammack, R., 1969
Assay, purification and properties of mammalian
D-2-hydroxy acid dehydrogenase.
Biochem. J., 115, 55
- Cori, C.F. u. G.T. Cori, 1929
Glycogen formation in the liver from d- and
l-lactic acid.
J. biol. Chem., 81, 389

- Dagley, S. u. D.E. Nicholson, 1970
An introduction to metabolic pathways.
Spottiswood, Ballantyne & Co Ltd, London
- Dakin, H.D., 1908
Note on the relative rate of absorption of optically isomeric substances from intestine.
J. biol. Chem., 4, 437
- Dakin, H.D. u. H.W. Dudley, 1913
On glyoxalase.
J. biol. Chem., 4, 423
- Dennis, D. u. N.D. Kaplan, 1963
Lactic acid racemization in *Clostridium butylicum*.
Biochem. Z., 338, 485
- Drury, D.R. u. A.N. Wick, 1965
Chemistry and metabolism of L(+) and D(-) lactic acids.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 119, 851
- Dunlop, R.H. u. P.B. Hammond, 1965
D-lactic acidosis of ruminants.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 119, 1109
- Elliott, W.H., 1959
Amino-aceton: its isolation and role in metabolism.
Nature, Lond., 183, 1051
- Gawehn, K. u. H.U. Bergmeyer, 1971
in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- Hinkson, R.S.jr., W.H. Hoover u. B.R. Poulton, 1967
Metabolism of lactate isomers by rat and sheep liver and rumen epithelial tissue.
J. Anim. Sci., 26, 799

- Hoberman, H.D. u. A.F. D'Adamo jr., 1960
Coupling of oxidation of substrates to reductive biosynthesis.
III. L- and D-lactates.
J. biol. Chem., 235, 514
- Hohorst, H.J., 1971
in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- Holten, C.H., 1971
Lactic acid.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- Huennekens, F.M., H.R. Mahler u. J. Nordmann, 1951
Studies on the cyclophorase system.
XVII. Occurrence and properties of alphahydroxy racemase.
Arch Biochem., 30, 77
- Karlson, P., 1972
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Krebs, H.A., 1955
in: Methods in enzymology, Bd. I, (S.P. Colowick u. N.O. Kaplan)
Academic Press Inc., Publishers New York
- Ladd, J.N. u. D.J. Walker, 1959
The fermentation of lactate and acrylate by the rumen micro-organism L.C.
Biochem. J., 71, 364
- Levene, P.A. u. G.M. Meyer, 1913
On the action of tissues on hexoses.
J. biol. Chem., 15, 65
- Ley, J. u. J. Schell, 1962
Lactate and pyruvate catabolism in acetic acid bacteria.
J. gen. Microbiol., 29, 589

Loockwood, L.B. u. D.E. Yorder, 1965

Lactic acid.

I. Chemistry and enzymology of lactate isomers.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 119, 854

Lundholm, L., E. Mohme-Lundholm u. N. Svedmyr, 1963

Comparative investigation of methods for determination of lactic acid in blood and in tissue extracts.

Scand. J. clin. Lab. Invest., 15, 311

Medzihradsky, F. u. W. Lamprecht, 1966

Stoffwechseluntersuchungen mit Essig-, Milch- und Citronensäure.

Z. Lebensmittelunters. u.-Forsch., 130, 171

Meyerhof, O. u. L. Lohmann, 1926

On respiration and carbohydrate utilization of animal tissues.

Biochem. Z., 171, 421

Monder, C., 1967

α -Keto aldehyde dehydrogenase, an enzyme that catalyzes the enzymic oxidation of methylglyoxal to pyruvate.

J. biol. Chem., 242, 4603

Neuberg, C., 1913

Weitere Untersuchungen über die biochemische Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure nebst Bemerkungen über die Entstehung der verschiedenen Milchsäuren in der Natur.

Biochem. Z., 51, 484

Otto, E., 1958

Biometrie.

Deutscher Bauernverlag

Rapoport, S., 1968

The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes.

Essays in Biochem., 4, 69

- Rehbinder, D., 1971
in: Lactic acid (C.H. Holten)
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- Sachs, L., 1968
Statistische Auswertungsmethoden.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Schiller, K., 1960
Ein Stoffwechselkäfig für Ratten.
Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkd., 15, 305
- Schimassek, H., 1965
Lactate metabolism in the isolated perfused rat
liver.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 119, 1013
- Scrutton, M.C. u. M.F. Utterer, 1968
The regulation of glycolysis and gluconeogenesis
in animal tissues.
Ann. Rev. Biochem., 37, 249
- Tarmy, E.M. u. N.O. Kaplan, 1965
Interacting binding sites of L-specific lactic
dehydrogenase of Escherichia coli.
Biochem. biophys. Res. Commun., 21, 379
- Tubbs, P.K., 1964
The metabolism of D- α -hydroxy acids in animal
tissues.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 119, 920
- Warnock, L.G., R.E. Koeppe, N.F. Inciane u.
W.E. Wilson, 1965
L(+) and D(-) lactate as precursors of muscle
glycogen.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 119, 1048
- Williams, V.J. u. D.D.S. Mackenzie, 1965
The absorption of lactic acid in the reticulo-
rumen of the sheep.
Aust. J. biol. Sci., 18, 917

Herrn Professor Dr. Dr. Dr. h.c. mult.
J. Brüggemann danke ich für die Überlassung
des Arbeitsplatzes im Institut für
Tierphysiologie der Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.
D. Giesecke für die Überlassung des Themas
und die jederzeit gewährte Unterstützung
und wissenschaftliche Anregung für das
Gelingen dieser Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn
Universitätsdozenten Dr. H. Erbersdobler
und Herrn Privatdozenten Dr. E. Scharrer
für die freundliche Beratung danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei
Fräulein Dr. R. Günzel und Fräulein
S. Wiesmayr für ihr entgegenkommendes
Interesse bei den technischen Problemen
dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 16. Juni 1947 wurde ich als Tochter des Uhrmacher- und Optikermeisters Alfons Fabritius und seiner Ehefrau Viktoria, geb. Rupprecht, in Gschwend (Wttbg.) geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Engelskirchen (Ndrh.-Westf.), von 1957 bis 1961 die Realschule in Overath. Im Frühjahr 1961 bestand ich die Aufnahmeprüfung am Staatlichen Aufbaugymnasium in Bergneustadt und legte dort 1966 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1966 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Universität München, das ich im Februar 1971 mit dem Staatsexamen abschloß.

Im August 1971 wurde mir die Approbation erteilt.

